

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E BIOLÓGICAS
NÚCLEO DE PESQUISA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**Caracterização de Fungos filamentosos com Potencial
para Biorremediação de Águas contaminadas com
Manganês**

Ester Alves Mota

Ouro Preto, 2015



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E BIOLÓGICAS
NÚCLEO DE PESQUISA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA



Caracterização de Fungos filamentosos com Potencial para Biorremediação de Águas contaminadas com Manganês

Orientador(a): Prof^a. Dr^a. Renata Guerra de Sá Cota

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia, área de concentração Genômica e Proteômica.

Ouro Preto, Minas Gerais – 2015

M917c

Mota, Ester Alves.

Caracterização de fungos filamentosos com potencial para biorremediação de águas contaminadas com manganês [manuscrito] / Ester Alves Mota. - 2015. xi, 91f.: il.: color; graf.; tabs.

Orientadora: Profa. Dra. Renata Guerra de Sa Cota.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Programa de Pós-graduação em Biotecnologia. Área de Concentração: Genômica e Proteômica.

1. Água - Purificação. 2. Manganês. 3. Fungos - Biotecnologia. 4. Água - Reutilização. 5. Biorremediação. I. Cota, Renata Guerra de Sa. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

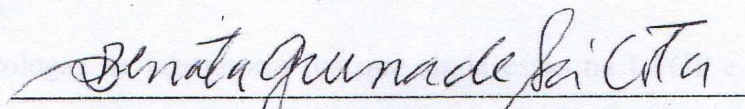
CDU: 628.515:546.711

Ata da Banca Examinadora de Defesa de Dissertação Intitulada:

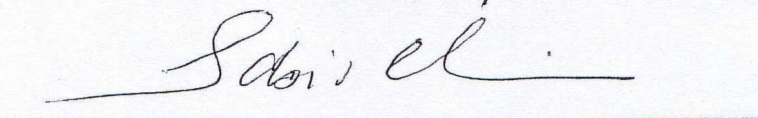
“Caracterização de Fungos filamentosos com potencial para biorremediação de águas contaminadas com manganês”

Aos dois dias do mês de março de 2015, às 14h00min, no Auditório do Bloco de Salas de Aula da Universidade Federal de Ouro Preto, reuniu-se a Comissão Examinadora da Dissertação da aluna Ester Alves Mota. A defesa da dissertação iniciou-se pela apresentação oral feita pela candidata e, em seguida, arguição pelos membros da banca. Ao final, os membros da banca examinadora reuniram-se e decidiram por APROVAR a candidata. A concessão do título está condicionada ao cumprimento das demais exigências previstas no Regimento deste Programa.

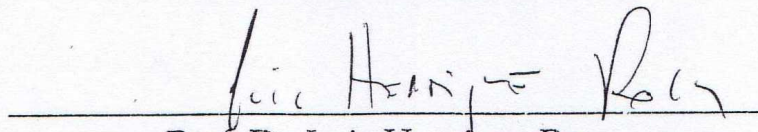
Membros da Banca Examinadora:



Profa. Dra. Renata Guerra de Sá Cota
Orientadora



Prof. Dr. Fábio Alexandre Chinalia
Examinador (UFBA)



Prof. Dr. Luiz Henrique Rosa
Examinador (UFMG)

DATA DA DEFESA: 02/03/2015

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, pela força, sabedoria e presença: *“Qual a macieira entre as árvores do bosque, tal é o meu amado entre os filhos; desejo muito a sua sombra, e debaixo dela me assento; e o seu fruto é doce ao meu paladar.”* (Ct 2:3 - ARC)

A minha orientadora Prof^a. Dr^a. Renata Guerra de Sá Cota, por ter me dado a oportunidade de trabalhar no LBBM desde novembro de 2011, por todo o aprendizado em Biologia Molecular, animação com o projeto e bom-humor;

As agências de fomento que possibilitaram a execução desse trabalho: Capes, Vale, Fapemig e UFOP;

A minha queridíssima mamãe (Maria Aparecida Alves Mota);

Aos meus irmãos Raquel, Sara, José Flávio, Samuel e Isaac;

Aos queridos colegas de laboratório (os que ainda estão na UFOP e os que foram para outras instituições) pela companhia nos cafés da tarde: Natália, Fabiano, Victor, Érica, Roberta, Karina, Marcela (*in memoriam*), Pollyana, Talita, Soraya e Regina.

Sumário

| | |
|---|-----|
| Lista de Figuras | i |
| Lista de Tabelas | vi |
| Lista de Abreviaturas e Siglas | vii |
| Resumo | x |
| Abstract..... | xi |
| 1. Introdução..... | 1 |
| 1.1-Manganês: contaminação e estabilidade..... | 1 |
| 1.2-Remediação química de águas contaminadas com manganês | 2 |
| 1.3-Mecanismos de remoção de Mn^{2+} por microrganismos | 3 |
| 1.3.1-Biossorção..... | 3 |
| 1.3.2-Acúmulo intracelular | 3 |
| 1.3.3-Precipitação extracelular | 4 |
| 1.4-Remoção do íon Mn^{2+} mediada por fungos..... | 4 |
| 1.5-Oxidação de Mn^{2+} mediada por enzimas | 6 |
| 1.5.1-Manganês peroxidase e Lacases: oxidação e caracterização | 6 |
| 1.5.2-Manganês oxidase | 9 |
| 1.6-Bioextração de Manganês | 10 |
| 1.7-Contexto da biorremediação de águas contaminadas com metais | 11 |
| 1.8- Características da água de rejeito usada neste estudo | 12 |
| 2. Objetivos..... | 14 |
| 2.1-Objetivo Geral..... | 14 |
| 2.2-Objetivos específicos | 14 |
| 3. Materiais e Métodos | 15 |
| 3.1- Isolamentos dos fungos..... | 15 |
| 3.2-Extração de DNA genômico pelo método CTAB/NaCl 10% | 15 |
| 3.3-Amplificação da região ITS1 e ITS2 e da região 18S ribossomal utilizando PCR..... | 16 |
| 3.3.1-Iniciadores..... | 16 |
| 3.4-Purificação dos produtos de PCR | 17 |
| 3.5 - Identificação Molecular | 18 |
| 3.6-Ensaio para avaliação do potencial de remoção de Mn^{2+} solúvel em meio de cultura | 18 |
| 3.7-Ensaio para avaliação do potencial de redução de MnO_2 insolúvel em meio de cultura | 19 |
| 3.8-Ensaio da Atividade da Lacase em placa..... | 19 |

| | |
|---|----|
| 3.9-Ensaio da atividade da lacase em diferentes concentrações de proteína..... | 19 |
| 3.9.1-Extrato Bruto..... | 19 |
| 3.9.2-Reação de atividade enzimática | 20 |
| 3.10-Identificação morfológica dos fungos..... | 20 |
| 3.10.1-Microcultivo..... | 20 |
| 3.10.2-Preparação das lâminas | 21 |
| 3.10.3- Microscopia eletrônica de Varredura – MEV | 21 |
| 3.10.4- EDS: Espectroscopia de energia dispersiva | 22 |
| 3.11-Ensaio para detecção da presença de manganês oxidado – Azul de leucoberbelina (LBB) 22 | |
| 3.11.1- Preparo da solução de reação – LBB | 23 |
| 3.11.2- Reação LBB | 23 |
| 4. Resultados e Discussão..... | 24 |
| 4.1- Isolamentos dos fungos..... | 24 |
| 4.2-Extração de DNA genômico pelo método CTAB/NaCl 10% | 26 |
| 4.3-Amplificação da região ITS1 e ITS2 e 18S ribossomal utilizando PCR | 27 |
| 4.4-Purificação dos produtos de PCR | 28 |
| 4.5 - Identificação Molecular | 29 |
| 4.6-Ensaio para avaliação do potencial de remoção de Mn^{2+} solúvel em meio de cultura | 40 |
| 4.6.1- Ensaio com 140 mgL^{-1} de Mn^{2+} | 40 |
| 4.6.2- Ensaio com 50 mgL^{-1} de Mn^{2+} | 43 |
| 4.7-Ensaio para avaliação do potencial de redução de MnO_2 insolúvel em meio de cultura | 45 |
| 4.8-Ensaio da Atividade da Lacase em placa | 47 |
| 4.9-Ensaio da atividade da lacase em diferentes concentrações de proteína..... | 53 |
| 4.10-Identificação morfológica dos fungos..... | 56 |
| 4.11-Ensaio para detecção da presença de óxidos manganês– Azul de Leucoberbelina (LBB).. | 66 |
| Conclusões..... | 71 |
| Perspectivas | 72 |
| Referências | 73 |
| Anexos..... | 81 |
| Anexo A: Alinhamento no CLUSTALW2 para o isolado 7 | 81 |
| Anexo B: Alinhamento no CLUSTALW2 para o isolado 18..... | 82 |
| Anexo C: Alinhamento no CLUSTALW2 para o isolado 23..... | 83 |
| Anexo D: Alinhamento no CLUSTALW2 para o isolado 26 | 85 |
| Anexo E: Espécies recuperadas..... | 87 |

| | |
|--|----|
| Anexo F: Árvore Filogenética referente ao isolado 18 – Sequências de material tipo | 89 |
| Anexo G: Árvore Filogenética referente ao isolado 26 – Sequências de material tipo..... | 90 |
| Anexo H: Árvore Filogenética referente ao isolado 31 – Sequências de material tipo..... | 91 |

Lista de Figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1: Mecanismos de biorremocão de manganês por microrganismos: interação do íon de manganês com a parede celular, ácidos, enzimas e elétrons provenientes do microrganismo resultando na precipitação do manganês. | 4 |
| Figura 2: Sinergia entre as enzimas lacase e manganês peroxidase: Formação de Mn ³⁺ quelado a um ácido orgânico, reação requer a presença de peróxido de hidrogênio, em detalhe o grupo heme da enzima manganês peroxidase mostrando a região de interação com o manganês (Souren, 1998; Schlosser <i>et al.</i> , 2002). | 7 |
| Figura 3: Distribuição dos elementos regulatórios ao longo da região promotora de genes da lacase de <i>Pleorotus ostreatus</i> : (*) HSE, (C) creA, (O) XRE, (S) SRE, (N) NIT, () TATA box, () MRE e () CG box (Piscitelli, 2011). | 8 |
| Figura 4: Estrutura da enzima multicobre oxidase e reação de oxidação do ABTS: Visão da multicobre oxidase com os sítios multicobre e seus respectivos átomos de cobre, oxidação em T1 e redução de oxigênio em água em T2 e T3 com a transferência de elétrons (Su <i>et al.</i> , 2013). | 9 |
| Figura 5: Posição de anelamento dos iniciadores na região ITS: Região amplificada pela reação de PCR. | 17 |
| Figura 6: Fungos isolados da água de rejeito de mina: aspectos morfológicos das culturas fúngicas em Agar <i>Sabouraud</i> , com a numeração do isolamento. | 26 |
| Figura 7: Análise da qualidade do DNA genômico: Cerca de 5µg de DNA genômico foram analisados em gel de agarose 0,6%, conforme descrito em Materiais e Métodos 3.2. O brometo de etídeo foi o corante intercalante de DNA utilizado para a visualização da amostra, com a incidência da luz UV no gel podemos visualizar a banda de DNA. | 27 |
| Figura 8: Análise dos amplicons utilizando o par de iniciadores ITS4/ITS5 e NS1/NS2- Três µL da reação de PCR foram analisados em gel de agarose 1,2%: A figura mostra a análise em duplicata para as amostras 23, 26 e 31 (1Kb Qiagen - ITS4/ITS5). A figura também mostra à direita as amostras 7 e 18 (Invitrogen plus Ladder - NS1/NS2). | 28 |
| Figura 9: Análise dos amplicons purificados utilizando o par de iniciadores NS1/NS2- Três µL da reação de PCR foram analisados em gel de agarose 1,2%. Como padrão de massa molecular, foi utilizado o 1Kb Invitrogen Plus Ladder. | 29 |

| | |
|--|----|
| Figura 10: Alinhamento Global: Foram utilizadas 3 sequências para a obtenção do consenso do isolado 7, 18, 23, 26 e 31, utilizando o alinhamento global CLUSTALW. A figura mostra o alinhamento das sequências correspondentes ao isolado 31 <i>Forward</i> , as demais encontram-se em anexo..... | 30 |
| Figura 11:Árvore filogenética baseada do isolado 7 na sequência da região 18S ribossomal: A árvore filogenética foi construída utilizando o algoritmo Kimura, <i>Neighbor-Joining</i> por meio do programa FigTree 1.4.2, mostrando que o isolado pertence ao gênero <i>Hypocrea</i> sp..... | 36 |
| Figura 12:Árvore filogenética baseada do isolado 18 na sequência da região 18S ribossomal: A árvore filogenética foi construída utilizando o algoritmo Kimura, <i>Neighbor-Joining</i> por meio do programa FigTree 1.4.2, mostrando que o isolado pertence ao gênero <i>Penicillium</i> sp. | 37 |
| Figura 13:Árvore filogenética baseada do isolado 26 na sequência da região ITS ribossomal: A árvore filogenética foi construída utilizando o algoritmo Kimura, <i>Neighbor-Joining</i> por meio do programa FigTree 1.4.2, mostrando que o isolado pertence ao gênero <i>Aspergillus</i> sp. | 38 |
| Figura 14:Árvore filogenética baseada do isolado 31 na sequência da região ITS ribossomal: A árvore filogenética foi construída utilizando o algoritmo Kimura, <i>Neighbor-Joining</i> por meio do programa FigTree 1.4.2, mostrando que o isolado pertence ao gênero <i>Cladosporium</i> sp..... | 39 |
| Figura 15: Remoção de Mn^{+2} por fungos filamentosos: A figura mostra a porcentagem de remoção de Mn^{2+} ao fim dos 35 dias de experimento. Os experimentos foram feitos em triplicata..... | 42 |
| Figura 16: Variação de pH do experimento de remoção de Mn^{2+} por fungos filamentosos: A figura mostra a dinâmica do pH durante os 35 dias de experimento. Os experimentos foram feitos em triplicata..... | 42 |
| Figura 17: Diagrama de potencial redox e pH em relação aos estágios de oxidação do Mn (Bruins <i>et al.</i> , 2015)..... | 43 |
| Figura 18:Remoção de Mn^{2+} por fungos filamentosos: A figura mostra a porcentagem de remoção de Mn^{2+} ao fim dos 35 dias de experimento. Os experimentos foram feitos em triplicata..... | 44 |
| Figura 19: Variação de pH do experimento de remoção de Mn^{2+} por fungos filamentosos: A figura mostra a dinâmica do pH durante os 35 dias de experimento. Os experimentos foram feitos em triplicata..... | 44 |

| | |
|--|----|
| Figura 20: Redução de MnO ₂ por fungos filamentosos: A figura mostra a porcentagem de redução de MnO ₂ ao fim dos 35 dias de experimento. Os experimentos foram feitos em triplicata..... | 46 |
| Figura 21: Variação de pH do experimento de redução de MnO ₂ por fungos filamentosos: A figura mostra a dinâmica do pH durante os 35 dias de experimento. Os experimentos foram feitos em triplicata..... | 47 |
| Figura 22: Atividade qualitativa da lacase em placa: a esquerda a placa controle com ABTS e manganês e a direita a placa com ABTS e sem manganês..... | 50 |
| Figura 23: Atividade qualitativa da lacase em placa: a esquerda o isolado 7, identificado como <i>Hypocrea</i> sp. crescendo na placa com ABTS e a direita o mesmo isolado suplementado com manganês na placa com ABTS. A figura mostra a não presença da enzima extracelular devido à ausência de atividade..... | 50 |
| Figura 24: Atividade qualitativa da lacase em placa: A) a direita o isolado 18, identificado como <i>Penicillium</i> sp. crescendo na placa com ABTS e a esquerda o mesmo isolado suplementado com manganês na placa com ABTS, podemos ver pequena atividade na figura 10.a no centro de cada placa, cultura de 5 dias. B) Aspecto das hifas 18 sem Mn ²⁺ – frente da placa cultura 16 dias, todo o meio apresenta uma coloração preto-azulada por causa da atividade da enzima. C) Aspecto das hifas 18 com Mn ²⁺ - cultura com 16 dias, verso da placa mostrando a evidência de atividade enzimática pelo surgimento da coloração preto-azulada..... | 51 |
| Figura 25: Atividade qualitativa da lacase em placa: A) a direita o isolado 23, crescendo na placa com ABTS e a esquerda o mesmo isolado suplementado com manganês na placa com ABTS com 3 dias de cultivo. B) Aspecto das hifas 23 sem Mn ²⁺ – frente da placa cultura 5 dias, todo o meio apresenta uma coloração azul-esverdeada por causa da atividade da enzima. C) Aspecto das hifas 23 com Mn ²⁺ - cultura com 15 dias, frente da placa mostrando a evidência de atividade enzimática pelo surgimento da coloração preto-azulada..... | 52 |
| Figura 26: Atividade qualitativa da lacase em placa: a esquerda o isolado 26, identificado como <i>Aspergillus</i> sp. crescendo na placa com ABTS e a direita o mesmo isolado suplementado com manganês na placa com ABTS. A figura mostra a não presença da enzima extracelular devido à ausência de atividade..... | 52 |
| Figura 27: Atividade qualitativa da lacase em placa: A) a esquerda o isolado 31, identificado como <i>Cladosporium</i> sp. crescendo na placa com ABTS e a direita o mesmo isolado suplementado com manganês na placa com ABTS com 3 dias de cultivo. B) | |

| | |
|---|----|
| Aspecto das hifas 31 sem Mn^{2+} – frente da placa cultura 1.5 dias, o meio ao redor da hifa apresenta uma coloração azul-esverdeada por causa da atividade da enzima. C) Aspecto das hifas 31 com Mn^{2+} - cultura com 6 dias, frente da placa mostrando a evidência de atividade enzimática pelo surgimento da coloração preto-azulada. | 53 |
| Figura 28: Isolado 18/18Mn – <i>Penicillium</i> sp.: reação de atividade de lacases em 50, 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$ de proteína em pH ácido. | 55 |
| Figura 29: Isolado 23/23Mn: reação de atividade de lacases em 50, 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$ de proteína em pH ácido. | 55 |
| Figura 30: Isolado 31/31Mn- <i>Cladosporium</i> sp.: reação de atividade de lacases em 50, 100 e 200 $\mu\text{g/ml}$ de proteína em pH ácido. | 56 |
| Figura 31: À esquerda <i>Hypocrea</i> sp. crescido na ausência de Mn^{2+} e à direita <i>Hypocrea</i> sp. crescido na presença de Mn^{2+} . Estrutura de reprodução assexuada. Aumento de 8000 e 6000X respectivamente. | 58 |
| Figura 32: À esquerda <i>Penicillium</i> sp. crescido na ausência de Mn^{2+} e à direita <i>Penicillium</i> sp. crescido na presença de Mn^{2+} . Estrutura de reprodução assexuada. Aumento de 6000 e 7000X respectivamente. | 58 |
| Figura 33: À esquerda, isolado 23 crescido na ausência de Mn^{2+} e à direita isolado 23 crescido na presença de Mn^{2+} Estrutura de reprodução assexuada. Aumento de 4000 e 7000X respectivamente. | 59 |
| Figura 34: À esquerda <i>Aspergillus</i> sp. crescido na ausência de Mn^{2+} e à direita <i>Aspergillus</i> sp. crescido na presença de Mn^{2+} . Estrutura de reprodução assexuada. Aumento de 6000 e 2000X respectivamente. | 59 |
| Figura 35: À esquerda <i>Cladosporium</i> sp. crescido na ausência de Mn^{2+} e à direita <i>Cladosporium</i> sp. crescido na presença de Mn^{2+} . Estrutura de reprodução assexuada. Aumento de 11000 e 10000X respectivamente. | 60 |
| Figura 36: EDS: <i>Hypocrea</i> sp. Mn e <i>Hypocrea</i> sp., nenhum manganês adsorvido na superfície da hifa. | 63 |
| Figura 37: EDS: Fungo <i>Penicillium</i> sp. Mn e <i>Penicillium</i> sp., nenhum manganês adsorvido na superfície da hifa. | 63 |
| Figura 38: EDS: Fungo 23Mn e 23, nenhum manganês adsorvido na superfície da hifa. .. | 64 |
| Figura 39: EDS: Fungo <i>Aspergillus</i> sp. Mn e <i>Aspergillus</i> sp., nenhum manganês adsorvido na superfície da hifa. | 64 |
| Figura 40: EDS: <i>Cladosporium</i> sp. e <i>Cladosporium</i> sp. Mn, nenhum manganês adsorvido na superfície da hifa. | 65 |

| | |
|---|----|
| Figura 41: BSE: Mapeamento de manganês nos isolados 7(<i>Hypocrea</i> sp.), 18 (<i>Penicillium</i> sp.) , 23, 26(<i>Aspergillus</i> sp.) e 31 (<i>Cladosporium</i> sp.) crescidos na presença de manganês. | 65 |
| Figura 42: Estrutura química do Azul de leucoberbelina. Fonte: Sigma Aldrich. | 66 |
| Figura 43: Ensaio LBB: controles realizados com várias concentrações de bióxido de manganês. Podemos ver da esquerda para a direita as seguintes concentrações: 0,0001mM, 0,0005mM, 0,001mM, 0,01mM e 0,05mM de bióxido de manganês PA, Sigma..... | 67 |
| Figura 44: Ensaio LBB: Reação de óxidos de Mn ³⁺ ou Mn ⁴⁺ presentes no meio de cultura do isolado 7 <i>Hypocrea</i> sp. Podemos ver na da esquerda para a direita o tubo correspondente ao tempo zero (T=0), 1ª semana de cultivo – 7 dias (1ªS), 14 dias de cultivo (2ªS), 21 dias de cultivo (3ªS), 28 dias de cultivo (4ªS) e 35 dias de cultivo (5ªS). | 67 |
| Figura 45: Ensaio LBB: O isolado 18 <i>Penicillium</i> sp. não apresenta óxidos de manganês suspensos no meio de cultura. Podemos ver na da esquerda para a direita o tubo correspondente ao tempo zero (T=0), 1ª semana de cultivo – 7 dias (1ªS), 14 dias de cultivo (2ªS), 21 dias de cultivo (3ªS), 28 dias de cultivo (4ªS) e 35 dias de cultivo (5ªS). | 68 |
| Figura 46: Ensaio LBB: O isolado 23 não apresenta óxidos de manganês suspensos no meio de cultura. | 69 |
| Figura 47: Ensaio LBB: O isolado 26 <i>Aspergillus</i> sp. não apresenta óxidos de manganês suspensos no meio de cultura. | 70 |
| Figura 48: Ensaio LBB: O isolado 31 <i>Cladosporium</i> sp. não apresenta óxidos de manganês suspensos no meio de cultura. | 70 |
| Figura 49: Árvore filogenética baseada do isolado 18 na sequência da região 18S ribossomal: A árvore filogenética foi construída utilizando o algoritmo Kimura, <i>Neighbor-Joining</i> por meio do programa FigTree 1.4.2, mostrando que o isolado pertence ao gênero <i>Penicillium/Talaromyces</i> | 89 |
| Figura 50: Árvore filogenética baseada do isolado 18 na sequência da região ITS ribossomal: A árvore filogenética foi construída utilizando o algoritmo Kimura, <i>Neighbor-Joining</i> por meio do programa FigTree 1.4.2, mostrando que o isolado pertence ao gênero <i>Aspergillus</i> | 90 |
| Figura 51: Árvore filogenética baseada do isolado 18 na sequência da região ITS ribossomal: A árvore filogenética foi construída utilizando o algoritmo Kimura, <i>Neighbor-Joining</i> por meio do programa FigTree 1.4.2, mostrando que o isolado pertence ao gênero <i>Cladosporium</i> | 91 |

Lista de Tabelas

| | |
|---|----|
| Tabela 1: Microrganismos na biorremocão de manganês (Sinha e Khare, 2013)..... | 12 |
| Tabela 2: Elementos presente na água de rejeito de mina e suas concentraes (Silva <i>et al.</i> , 2012)..... | 13 |
| Tabela 3: Reagentes empregados na PCR (Kit Fermentas)..... | 16 |
| Tabela 4: Iniciadores utilizados na PCR..... | 17 |
| Tabela 5: Microrganismos encontrados na água de rejeito de mina com 140mg L ⁻¹ de Mn ²⁺ | 25 |
| Tabela 6: Alinhamento local Blast utilizando a sequência do consenso 7 com as sequências depositadas no banco de dados NCBI. | 31 |
| Tabela 7: Alinhamento local Blast utilizando a sequência do consenso 18 com as sequências depositadas no banco de dados NCBI. | 32 |
| Tabela 8: Alinhamento local Blast utilizando a sequência do consenso 26 com as sequências depositadas no banco de dados NCBI. | 33 |
| Tabela 9: Alinhamento local Blast utilizando a sequência do consenso 31 com as sequências depositadas no banco de dados NCBI. | 34 |
| Tabela 10: Alinhamento local Blast utilizando a sequência do consenso 18 com as sequências de material tipo depositadas no banco de dados NCBI..... | 87 |
| Tabela 11: Alinhamento local Blast utilizando a sequência do consenso 26 com as sequências de material tipo depositadas no banco de dados NCBI..... | 87 |
| Tabela 12: Alinhamento local Blast utilizando a sequência do consenso 31 com as sequências de material tipo depositadas no banco de dados NCBI..... | 88 |

Lista de Abreviaturas e Siglas

+: mais ou positivo
-: menos
%: Porcentagem
°C: Graus Celsius
ΔAbs: Variação da absorbância
ε : Coeficiente de extinção molar
μg: Micrograma
μL: Microlitro
μM: Micromolar
μm: Micrômetro
ABTS: 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6- ácido sulfônico)
ADBP: 4-Amino-2,6-dibromofenol
Al: Alumínio
As: Arsênio
ARE: Elemento em resposta a antioxidantes
AY: **Meio** de cultura de extrato de levedura e acetato de sódio
BCA: Ácido bicinconínico
BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*
BSE: Elétrons retroespalhados
C: Carbono
Ca: Cálcio
Cd: Cádmiio
Cl₂: Dicloro
Co: Cobalto
Cu: Cobre
CO₂: Gás carbônico
Cr: Cromo
CTAB: Brometo de cetiltrimetilamônio
DAB: -3,3-Diaminobenzidina
dm³: decímetro cúbico
DMA: N,N- Dimetilformamida dimetilacetato
DMP: Dess-Martin periodinano
DMPPDA: N,N-Dimetil-*p*-diaminafenileno dihidrocloroto
DNA: Ácido desoxirribonucléico
DNAg: DNA genômico
dNTP: Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
DPI: Cloreto iodônio difenileno
EDS: Espectrometria de Dispersão de Energia
EDTA: Etileno amino tetra-acetato de sódio diidratado
Eh: Potencial redox
eV: Elétron-volt
Fe: Ferro
g: Gramas
HBT: 1-Hidroxibenzotriazol
H₂O: Água
H₂O₂: Peróxido de hidrogênio
HSE: Elemento em Resposta a Choque térmico

K: Potássio
Kb: Quilobase
KDa: Quilo Dalton
K₂HPO₄: Fosfato de potássio dibásico
KMnO₄: Permanganato de Potássio
LBB: Azul de Leucoberbelina - N.N'-Dimetilamino-p,p'-trifenilmetano-o"- ácido sulfônico
M: Molar
m³: metro cúbico
Mb: Megabase
Mco: Multicobre oxidase
MEV: Microscópio Eletrônico de Varredura
Mg: Magnésio
mg: Miligramas
mL: Mililitro
mM: Milimolar
Mn: Manganês
MnO_x: Óxido de manganês
MnP: Enzima manganês peroxidase
MgCl₂: Cloreto de Magnésio
MgSO₄.7H₂O: Sulfato de magnésio
MnSO₄: Sulfato de manganês
MRE: Elementos em Resposta a Metais
n^o: Número
Na: Sódio
NaCl: Cloreto de Sódio
NBT: Azul nitro tetrazólio
NCBI: *National Center for Biotechnology Information*
NADPH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
ng: Nanograma
(NH₄)₂SO₄: Sulfato de Amônio
NH₄NO₃: Nitrato de amônio
NH₄OH: Hidróxido de amônio
nm: Nanômetro
O: Oxigênio
O₂: Oxigênio gasoso
O₃: Ozônio
P: Fósforo
Pb: Chumbo
pb: Pares de bases
PCR: Reação em cadeia da polimerase
pH: Potencial hidrogeniônico
P/V: Peso por volume
PY: Meio peptona e extrato de levedura
rpm: Rotações por minuto
S: Enxofre
SE: Elétrons secundários
Si: Silício
SOD: Superóxido dismutase
SRE: Elementos em Resposta a Estresse
Taq: Enzima Taq (*Thermophilus aquaticus*) DNA Polimerase

TBE: Tris – Ácido Bórico – EDTA

TWEEN 80: Polisorbato 80

U/mL: Unidades por mililitro

UV: Ultravioleta

V/V: Volume por volume

X: Vezes

XRE: Elementos em Resposta a Xenobióticos

YPD: Meio contendo glicose, peptona e extrato de levedura

Zn: Zinco

Resumo

Devido à alta estabilidade do íon manganês (Mn^{2+}) em solução aquosa, existe uma grande dificuldade para removê-lo de águas contaminadas. Uma das formas de remover o Mn^{2+} é a utilização de microrganismos que podem oxidar o íon Mn^{2+} . Fungos podem remover o Mn^{2+} por vários mecanismos dentre eles a oxidação mediada por lacase e adsorção. Esse trabalho teve como objetivo isolar fungos a partir de água de drenagem de mineração de Mn e testar a capacidade de biorremoxão do íon Mn^{2+} de cinco isolados (7,18,23,26 e 31). Os fungos foram isolados utilizando Agar batata, mineral e *Sabouraud*. Os ensaios de biorremoxão do Mn^{2+} pelos isolados foram realizados utilizando-se caldo *Sabouraud* contendo 140 e 50 mgL^{-1} do íon Mn^{2+} . O decaimento da concentração de Mn^{2+} solúvel foi medido por espectrometria de emissão atômica com fonte plasma. Foram realizados ensaios de biorredução usando bióxido de manganês nas mesmas condições. Os fungos foram cultivados em meio suplementado com 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) para testar a produção de lacases extracelulares. A morfologia foi detectada por microscopia eletrônica de varredura e a composição de metais nas hifas por adsorção, foi caracterizada por EDS. A identificação dos isolados foi realizada utilizando análise filogenética da região do rRNA do 18S e ITS. Foi feito teste com N,N'-Dimetilamino-p,p'-trifenilmetano-o"-ácido sulfônico para detecção de Mn^{3+}/Mn^{4+} extracelular. O teste de presença de lacases foi positivo para os isolados 18, 23 e 31. Observou-se uma remoção de Mn^{2+} de 86,07% e 96% para o isolado 31 em 140 e 50 mgL^{-1} do íon Mn^{2+} , respectivamente, sem ocorrer redução no ensaio com MnO_2 . A filogenia sugere que o isolado 7 pertence ao gênero *Hypocrea*; o isolado 18, *Penicillium*; o isolado 26, *Aspergillus* e o isolado 31, *Cladosporium*. As análises de microscopia eletrônica de varredura corroboram os resultados moleculares. A EDS mostrou que o Mn^{2+} removido está adsorvido nas hifas apenas de *Cladosporium*. *Hypocrea* foi capaz de oxidar Mn^{2+} a Mn^{3+}/Mn^{4+} no meio de cultura. Em conjunto os resultados demonstram que o isolado pertencente ao gênero *Cladosporium* é o mais eficiente na biorremoxão de Mn^{2+} , utilizando o mecanismo de adsorção associado à secreção de lacase extracelular. Novos experimentos serão feitos para verificar se a presença de lacases contribui para a biorremoxão ou se a taxa de biorremoxão observada é ocasionada somente pela adsorção.

Palavra-chave: Biorremoxão, manganês, fungos.

Abstract

Because manganese ion (Mn^{2+}) is high stability in aqueous solution, there is a large difficult to remove it from waste waters. One way to remove Mn^{2+} of the environment from Mn^{2+} contamination is through manganese oxidizing microorganisms. Fungi may remove Mn^{2+} by mechanisms like as adsorption, chelating and laccase oxidation. The aim of this work was the isolating fungi from mine drainage waters and to test the manganese removal ability of the five isolates (7, 18, 23, 26 e 31). The fungal strains were isolated using potato, mineral and *Sabouraud* agar. Mn^{2+} removal assays were performed in *Sabouraud* medium plus 140 and 50 mgL^{-1} Mn^{2+} and the decrease of Mn^{2+} concentration in the growth media was measured through atomic emission spectroscopy by plasma. Biological reduction assays was performed using manganese dioxide at the same conditions. The isolates were tested about the production of extracellular laccases in *Sabouraud* agar plus 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid). Hyphal morphologies were characterized in scanning electronic microscopy and the metal adsorbed on the cells were detected by EDS. Molecular phylogeny was made through 18S rRNA or ITS sequenced fragments. N,N'-Dimethylamino-p,p'-triphenylmethane-o"-sulphonic acid test was employed to detect Mn^{3+}/Mn^{4+} forms indicating fungal manganese removal by oxidizing mechanisms. The presence of laccase test was positive for isolates 18, 23 and 31. There was a removal of 86.07% and 96% for the isolate 31 at 140 and 50 mgL^{-1} Mn^{2+} ion, respectively, manganese oxide biological reduction. Phylogeny showed that the 7 isolated belongs to *Hypocrea* genus; 18, *Penicillium*; 26, *Aspergillus* and 31 strain belongs to *Cladosporium*. Scanning electronic microscopy corroborates the molecular phylogeny identification. EDS analysis has been determined adsorption capacity or uptake to *Cladosporium*. *Hypocrea* oxidize Mn^{2+} to Mn^{3+}/Mn^{4+} in *Sabouraud* growth medium. Taken the results demonstrate that the isolated belonging to the genus *Cladosporium* are the most efficient in Mn^{2+} removal, probably using the adsorption mechanism associated with the secretion of extracellular laccase. Further experiments will be performed to discover the laccases effects in the rate of Mn^{2+} removal.

Key-words: biological removal, manganese, fungi.

1. Introdução

1.1-Manganês: contaminação e estabilidade

O manganês (Mn) é um elemento de massa atômica 55, que está situado na coluna 7B da tabela periódica. O manganês pode ser encontrado em diversos estágios de oxidação, estendendo de Mn^0 a Mn^{7+} . Condições como pH, temperatura e Eh influencia na mudança de estado de oxidação do elemento Mn. Além disso, a presença de cloretos, sulfatos e nitratos aumenta a solubilidade do Mn (Sinha e Khare, 2013; Bruins *et al.*, 2015).

O Mn é encontrado na forma de óxidos, silicatos e carbonatos, principalmente . São exemplos de óxido de Mn a pirolusita e a manganita e de carbonatos, a rodocrosita (Acharya *et al.*, 2003; Sinha e Khare, 2013). A formação do íon Mn^{2+} é termodinamicamente favorável em ambientes anóxicos e que apresentam pH ácido. Este é o íon que este estudo se propõe a remover, ele pode ser encontrado solúvel como cloreto e sulfato de manganês ou precipitado na forma de carbonato de manganês. A formação de íons de Mn^{3+}/Mn^{4+} é termodinamicamente estável em ambientes oxigenados e em pH básico, em ambientes oxigenados o Mn^{3+}/Mn^{4+} é encontrado na forma de oxi-hidróxidos (Thompson *et al.*, 2005).

O setor siderúrgico é o que mais absorve o Mn extraído, cerca de 90%, sendo que ele é utilizado como agente dessulfurante por diminuir a quantidade de enxofre e desoxidante por apresentar maior afinidade com o oxigênio do que com o ferro, o Mn é usado principalmente em ferroligas (Ibram, 2012). Além disso, o Mn é utilizado na fabricação de ração para cães, na vidraçaria e o dióxido de manganês é utilizado na produção de pilhas alcalinas por meio da ligação com o zinco (Mukherjee *et al.*, 2004).

O Brasil possui a 4º reserva mundial do minério, que representa 10% do total mundial, atrás da Ucrânia (24%), África do Sul (22%) e Austrália (16%). O beneficiamento do minério de Mn resulta na contaminação de efluentes, causando prejuízos ambientais. A resolução do CONAMA nº. 357/05 regulamenta que em efluentes haja concentrações que não excedam 1,0 mg/L e em águas classe II, 0,1 mg/L. Altos níveis de manganês solúvel em água (Mn^{2+}), podem causar turbidez coloidal da água, o que impede a penetração de luz, desestabilizando organismos fotossintéticos presentes em ambientes aquáticos, além de causar incrustações em tubulações, danificando sistemas de distribuição e tratamento de água (Sinha e Khare, 2013).

A ingestão de alimentos e água com altas concentrações de Mn pode, em longo prazo, conduzir o indivíduo a apresentar sintomas neurotoxicológicos irreversíveis. A inalação de fuligem rica em Mn pode causar uma neuropatia semelhante ao mal de Parkinson, que também é irreversível e mais comumente detectada em operários de mineradoras e outras indústrias que utilizam o mineral de forma direta (WHO, 2008). Diante desses fatos o Ministério da Saúde regulamenta que a água destinada ao consumo deve conter no máximo 0,1mg/L (Portaria 2.914/11).

1.2-Remediação química de águas contaminadas com manganês

Para o tratamento de efluentes ou águas de rejeito de mina com altas concentrações de Mn^{2+} são usados processos ativos, onde são adicionadas grandes quantidades de agentes oxidantes e de químicos que elevam o pH da água fazendo com que a oxidação do Mn^{2+} seja favorável. Os agentes oxidantes empregados são normalmente o Cl_2 , O_3 , ou H_2O_2 , para aumentar o pH são usados compostos alcalinos como o carbonato de cálcio, carbonato de sódio e hidróxido de sódio. Com o aumento do pH e a presença de agentes oxidantes, o Mn^{2+} precipita, podendo formar óxidos (Mn^{3+} ou Mn^{4+} mais comumente) ou carbonatos de manganês (Mn^{2+} precipitado sem mudar estágio de oxidação). O íon Mn precipitado é facilmente removido por filtração. Esse processo ativo requer o uso de agitadores, precipitadores e clarificadores que fazem o procedimento se tornar custoso, esse processo também gera grandes quantidades de um lodo rico em diversos metais que demanda altos custos e protocolos de descarte. (Johnson *et al.*, 2005; Sinha e Khare, 2013)

Existem métodos que empregam adsorventes para o tratamento de efluentes com altas concentrações de metais. Um adsorvente que pode ser aplicado para esse fim, é a zeólita, que é produzida em um tratamento hidrotérmico das cinzas do carvão mineral em meio alcalino. Essas cinzas são constituídas basicamente de alumina e sílica. O uso dessas zeólitas é benéfico, pois remove certa quantidade de metais de águas de drenagem e reduz o rejeito de cinzas minerais geradas pela indústria de geração de energia termelétrica. Dentre os íons metálicos testados no experimento de remoção de metais de água de mina de drenagem, o Mn^{2+} foi o íon menos removido, pois seu raio e energia de hidratação são maiores que dos outros metais fazendo com que ele tenha menos afinidade com a zeólita, sendo a afinidade química uma propriedade fundamental nesse tratamento que é baseado em troca iônica. Os íons metálicos testados foram, em ordem de afinidade com a zeólita: $Cr > Pb > Fe > As > Cu > Zn > Cd > Mn$. A zeólita saturada com os íons pode ser

descartada em aterro sanitário sem risco de lixiviação para lençol freático devido às forças de adsorção (Fungaro e Izidoro, 2006).

Outra estratégia de remediação química é por meio da tecnologia passiva de tratamento, em que a água de mina de drenagem flui em um dreno impermeável ao ar e a água atravessa um leito de cascalho calcário. Um problema comum dentro do dreno de cascalho é a formação de um gel de carbonato manganoso e ferroso que impede a dissolução do calcário que é o neutralizante. Uma desvantagem é que esse tipo de tratamento de água é usado para complementar outro tratamento, como o de *wetlands* (Johnson *et al.*, 2005).

1.3-Mecanismos de remoção de Mn²⁺ por microrganismos

1.3.1-Biossorção

A biossorção de metais desempenhada por fungos envolve mecanismos de quelação, adsorção, ancoramento dos metais em proteínas ou de outras biomoléculas estruturais de membrana, complexação de metais na parede celular de quitina e metilação de metais (Gadd, 2010). A adsorção pode iniciar com a complexação de metais na estrutura de quitina e posteriormente formação de microprecipitações de metais, estes metais atrairiam outros metais por afinidade química, provocando precipitados maiores que por fim seriam desprendidos da quitina como mostra a Figura 1. Em leveduras, metais quelados na parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* ocorrem devido à coordenação com grupos carboxila, hidroxila e amino (Gavrilescu, 2004). A superfície das células dos microrganismos é negativamente carregada, isso facilita a interação com metais, sendo que a biossorção pode ocorrer como consequência da formação de biofilme e substâncias secretadas que promovem a adesão. Zigomicetos apresentam grandes proporções de quitina, quitosana e glicana na composição de suas paredes celulares. A biomassa de *Aspergillus niger* e *Mucor rouxii* é muito utilizada como biossorvente de vários metais, dispensando os custos de manutenção de nutrientes para os microrganismos (Gavrilescu, 2004; Zhou *et al.*, 2005).

1.3.2-Acúmulo intracelular

Geralmente esse processo requer um sistema de transporte específico com gasto de energia. A imobilização de metais, neste caso, pode ser ocasionada pela ligação a peptídeos específicos, polímeros ou íons aos metais provenientes do influxo. Foi demonstrado por meio da técnica de microscopia eletrônica de transmissão, que o fungo *Cladosporium*

cladosporioides tem a capacidade de acumular precipitados de manganês dentro da hifa, entretanto, o mecanismo de como acontece o transporte de Mn^{2+} permanece pouco compreendido (Shao e Sun, 2007).

1.3.3-Precipitação extracelular

O efeito indireto de vários ácidos, carboxilatos, fosfatos, hidróxidos e outros subprodutos metabólicos de microrganismos podem desencadear a precipitação de metais, bem como a presença de componentes reativos que se associarão aos metais promovendo a precipitação (Figura 1). Em fungos pode ocorrer também devido a ação de enzimas extracelulares (Gadd, 2004).

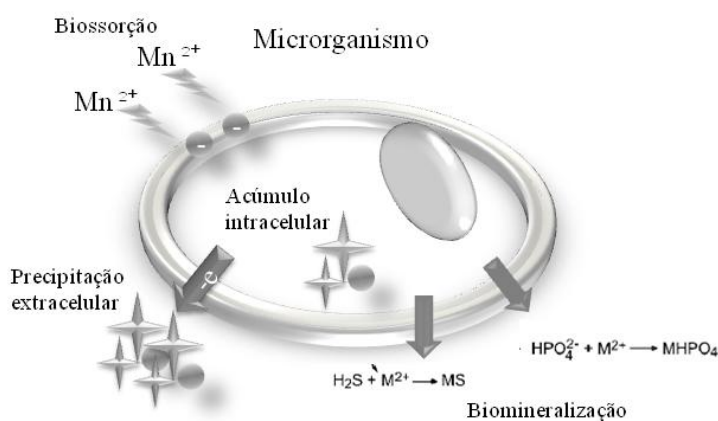


Figura 1: Mecanismos de biorremediação de manganês por microrganismos: interação do íon de manganês com a parede celular, ácidos, enzimas e elétrons provenientes do microrganismo resultando na precipitação do manganês.

1.4-Remoção do íon Mn^{2+} mediada por fungos

Thompson *et al.* (2006) testou a remoção de Mn^{2+} em solos usando uma concentração de 800 mg kg^{-1} e acumulações de óxidos de manganês foram observadas ao redor de hifas de fungos do gênero *Gaeumannomyces* por meio de análises de espectroscopia XANES. A oxidação que ocorreu nestas amostras de solo foi atribuída à presença de fungos, isso devido ao aumento da temperatura do solo contendo microrganismos e íons metálicos acima de 50°C ou diminuição para 3°C ter acarretado na interrupção de precipitação do manganês, essa condição é inadequada para o crescimento da maioria de fungos e bactérias.

Fungos do gênero *Paraconiothyrium* mostraram capacidade de oxidar 300 gm^{-3} de Mn^{2+} e toleram até 380 gm^{-3} de Mn^{2+} , esses ensaios foram feitos em meio PY, em pHs

neutros. As análises de espectroscopia de raio-X (XRD) revelaram que a estrutura de óxido predominante era a birnessita (Sasaki, 2006). O mesmo grupo de pesquisa também mostrou que fungos do gênero *Phoma* são capazes de oxidar mais de 100 mg dm^{-3} , sendo que essa espécie foi testada em um meio simulando uma água contaminada de área de drenagem de mina de manganês com uma concentração de 1.45 mol m^{-3} de Mn^{2+} (80 mg dm^{-3}). O grupo também demonstrou que a remoção do íon Mn^{2+} era mais eficiente, quando fibra de carbono era adicionada ao meio (Sasaki, 2004; Sasaki, 2008).

Hansel *et al.* (2012) detectou que os óxidos de manganês produzidos pelos fungos que ele caracterizou são descontínuos, apresentando porosidade na estrutura do cristalino em relação aos óxidos abióticos, essa característica dos óxidos biogênicos facilita a sorção de Mn^{2+} e de outros metais por afinidade química. Óxido biogênico de manganês beneficia o fungo contra a entrada de metais tóxicos na hifa, pois a estrutura desse óxido de manganês é porosa e capturaria metais próximos. O fungo *Stilbella aciculosa* é um ascomiceto filamentosos isolado de água de mina de drenagem ácida que tem capacidade de oxidar Mn^{2+} a Mn^{3+} e Mn^{4+} , os óxidos neste fungo são produzidos por mecanismos desconhecidos e se localizam principalmente na base dos conídios, que são estruturas responsáveis pela reprodução assexuada de fungos. Hansel *et al.* (2012) mostraram que, tanto o radical superóxido como o peróxido de hidrogênio, estão localizados na base da estrutura do conídio, esse é um indício do mecanismo pelo qual o íon Mn^{2+} é oxidado, isso foi detectado pela reação do radical superóxido com NBT (o superóxido reduz o NBT em formazan, um produto de cor azul-púrpura) e também pela reação de peróxido de hidrogênio com DAB, um precipitado marrom é formado indicando a reação.

Learman *et al.* (2013) e Hansel *et al.* (2012) reforçam a hipótese que a oxidação de Mn^{2+} é induzida pela presença desses radicais, pois, quando SOD é adicionado, a oxidação de Mn^{2+} é interrompida, quando outros sequestradores de superóxido são adicionados ao sistema a oxidação também é interrompida (cobre divalente). A adição de DPI, que é um inibidor de oxidoredutases transmembrana, como as NAD(P)H, interrompe a formação de óxidos de manganês, pois a formação de radicais superóxido está condicionada a ação de enzimas oxidases NADPH. Então, o estudo indica que a diferenciação das células das hifas quando o fungo está em fase de reprodução assexuada produz tanto superóxido, como peróxido de hidrogênio, que são os agentes oxidantes do íon Mn^{2+} , a oxidação do metal está condicionada a presença dessas estruturas reprodutivas no microrganismo em questão.

Tang *et al.* (2013) pertencem ao mesmo grupo que caracterizou *S.aciculosa*. Eles isolaram espécies dos gêneros *Stagonospora* e *Pyrenochaeta* e perceberam que essas

espécies eram capazes de realizar dissolução de rodocrosita e converter em óxidos de manganês, a rodocrosita é um mineral composto por carbonato de manganês, que é Mn^{2+} precipitado, porém na forma reduzida. Eles descartaram a possibilidade de oxidação de manganês mediada por enzimas extracelulares, pois eles adicionaram Mn^{2+} (tanto na forma de carbonato de manganês como na forma solúvel em meio de cultura que é o cloreto de manganês ou sulfato de manganês) ao meio de cultura filtrado livre de células que os fungos estavam crescendo e não foi observada nenhuma oxidação de manganês. Também houve presença de radicais superóxido e inibição da oxidação de Mn^{2+} na presença de inibidores de oxidoredutases (DPI) e sequestradores de radicais superóxido (cobre divalente). Os óxidos de manganês estavam ao redor das hifas, sobre a rodocrosita ou apresentavam formatos de flores próximos às hifas. Os precipitados em forma de flores apresentavam projeções transversais que eram delgadas demais para serem hifas, foi hipotetizado que estas projeções seriam polímeros orgânicos micogênicos associados ou não a proteínas que no processo de oxidação de Mn^{2+} por superóxido davam o aspecto de flores aos precipitados.

1.5-Oxidação de Mn^{2+} mediada por enzimas

1.5.1-Manganês peroxidase e Lacases: oxidação e caracterização

A enzima manganês peroxidase é uma glicoproteína que possui um grupo heme, como mostra a Figura 2. Esta enzima está envolvida na oxidação de lignina, o radical superóxido produzido é reduzido pelo Mn^{2+} , formando Mn^{3+} e H_2O_2 (Schlosser *et al.*, 2002). O íon Mn^{2+} também pode se oxidado pela complexação do metal a algum quelador orgânico ácido, como o malonato, oxalato, etc em reações com a enzima lacase, como mostra a Figura 2. A oxidação de Mn^{2+} a Mn^{3+} pode ser inibida pela adição de azida de sódio formando o radical azidil, este se liga em um sítio oposto ao sítio em que o Mn^{2+} se associa (Souren, 1998).

Lacases são enzimas da família das multicobre oxidases. Estas enzimas catalisam a oxidação de vários substratos com conseqüente redução de O_2 a H_2O . Existem lacases em fungos, plantas, seres humanos (ceruloplasmina), dentre outras. Existem lacases intra e extracelulares (podendo ocorrer na membrana/periplasma). As lacases em geral possuem uma baixa especificidade ao substrato, elas podem degradar lignina, diversos compostos fenólicos em resposta a presença de compostos aromáticos tóxicos, a redução do oxigênio

em água minimiza o estresse oxidativo gerado pela oxidação das moléculas (Madhavi *et al.*, 2009).

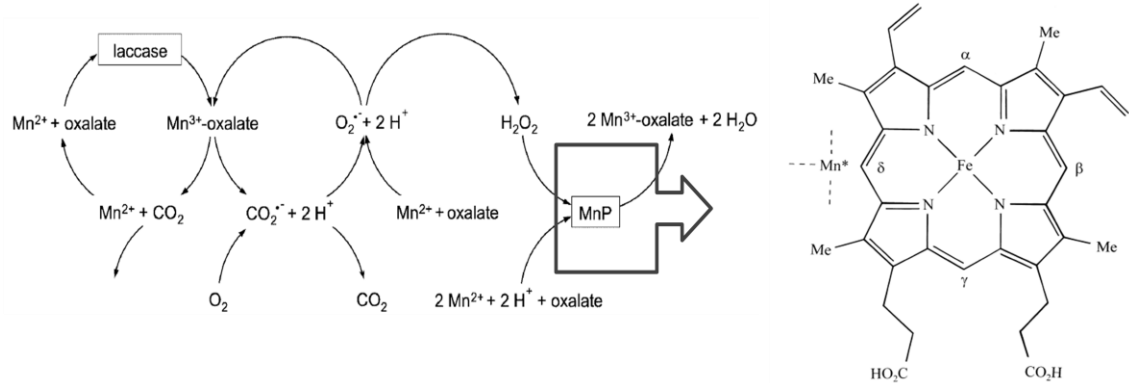


Figura 2: Sinergia entre as enzimas laccase e manganeso peroxidase: Formação de Mn^{3+} quelado a um ácido orgânico, reação requer a presença de peróxido de hidrogênio, em detalhe o grupo heme da enzima manganeso peroxidase mostrando a região de interação com o manganeso (Souren, 1998; Schlosser *et al.*, 2002).

As lacases ocorrem em múltiplas isoenzimas induzíveis ou não. Existem lacases que possuem sequências que respondem a elementos reguladores ao longo da região promotora dos genes. Na Figura 3 podemos ver que a região promotora contém elementos de resposta a metais (MRE), aos antioxidantes (ARE), a choque de temperatura (HSE) e a xenobióticos (XRE) que induzem a expressão dos genes da laccase (Piscitelli, 2011). Os elementos em resposta a metais, MRE, em muitas lacases, estão associados a elementos do tipo ACE-1 que ativa a expressão dos genes da laccase em resposta a abundância de cobre. A presença de elementos NIT e creA em certas lacases, faz com que a expressão de seus genes seja reprimida na presença de altas concentrações de nitrogênio inorgânico e glicose (Janusz *et al.*, 2013).

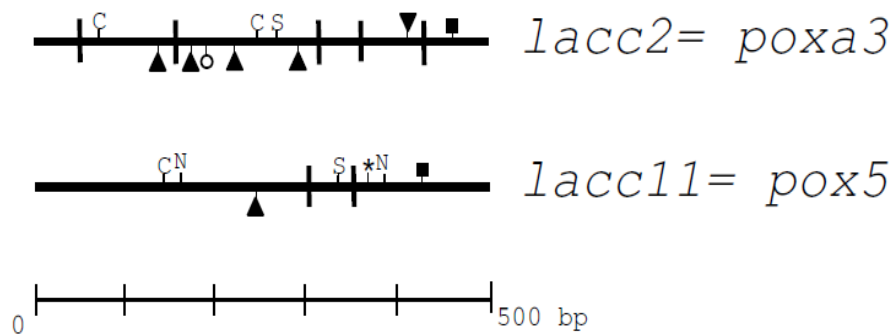


Figura 3: Distribuição dos elementos regulatórios ao longo da região promotora de genes da lacase de *Pleurotus ostreatus*: (*) HSE, (C) creA, (O) XRE, (S) SRE, (N) NIT, (■) TATA box, (▲) MRE e (▼) CG box (Piscitelli, 2011).

O pH ótimo para a atividade das lacases depende principalmente das propriedades do substrato, porém lacases fúngicas, normalmente apresentam uma ação favorecida em pH na faixa de 3-7. Já as lacases de plantas possuem atividade ótima em pH em torno de 9. Na presença de mediadores redox as lacases podem aumentar a especificidade a substratos bem como expandir seu potencial de oxidação a compostos não fenólicos. Neste caso, a lacase oxida o mediador redox que por sua vez, oxida diversos substratos através do radical formado. O ABTS como mostra a Figura 4 e o HBT são exemplos de mediadores redox, eles também são muito usados em reações de cinética enzimática e testes qualitativos de ocorrência de lacases extracelulares. A reação de ABTS com a enzima lacase apresenta um pH ótimo entre 3-5. Quando o cobre T1 é reduzido na reação com ABTS ele exibe uma coloração azul esverdeada (Kunamneni *et al.*, 2008).

Como mostra a Figura 4, existem três sítios nas lacases: (i) o sítio T1 é chamado sítio do cobre azul, ele contém um átomo de cobre, é o sítio responsável pela oxidação do substrato e transferência dos elétrons para os sítios T2(ii) e T3(iii) que são responsáveis pela redução do oxigênio em água, sendo que o sítio T3 possui dois átomos de cobre (Baldrian, 2006). Existem diversos inibidores das lacases, normalmente eles inibem a enzima por bloquearem a transferência interna de elétrons, entre T2 e T3, tais como azidas, cianidas, hidróxidos, entre outros (Madhavi *et al.*, 2009).

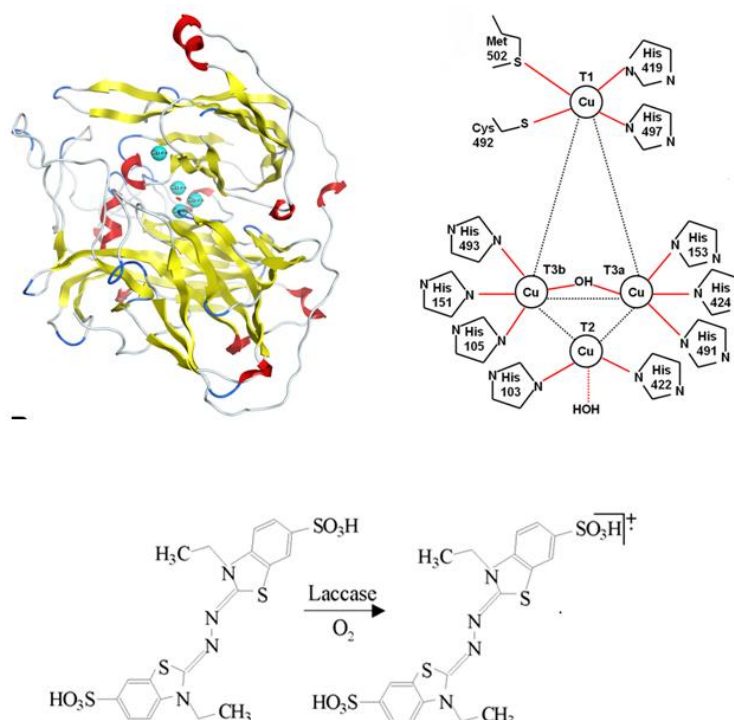


Figura 4: Estrutura da enzima multicobre oxidase e reação de oxidação do ABTS: Visão da multicobre oxidase com os sítios multicobre e seus respectivos átomos de cobre, oxidação em T1 e redução de oxigênio em água em T2 e T3 com a transferência de elétrons (Su *et al.*, 2013).

1.5.2-Manganês oxidase

A enzima manganês oxidase é uma multicobre oxidase, que apresenta inibidores iônicos similares aos que inibem a enzima lacase. Esta enzima apresenta atividade ótima em pH neutro e segue a cinética de Michaelis Mentem. Estudos mostraram que em ensaios feitos com fungos do gênero *Acremonium* e meio AY suplementado com Mn^{2+} , houve um decréscimo da oxidação de Mn^{2+} em pH acima de 7.5 e em pH abaixo de 6.6, já em pHs acima de 8.0 houve a perda total da atividade da enzima. Tris e tampões fosfato inibem atividade da enzima manganês oxidase (Mn^{2+} se associa ao tris ou ao fosfato). Essa enzima isolada de fungos do gênero *Acremonium* possui massa de 54kDa, enquanto uma lacase convencional tem entre 60-80 kDa. Ensaios feitos com a enzima manganês oxidase purificada do fungo *Acremonium*, mostraram que esta enzima é inibida na presença de malonato e pirofosfato pelo mesmo mecanismo de inibição observado quando Tris é adicionado ao meio. Isso mostra que esta enzima é diferente das lacases, visto que malonato é uma das substâncias queladoras de Mn^{2+} , transformando este íon em Mn^{3+}/Mn^{4+} . A enzima manganês oxidase não apresentou formação de Mn^{3+} , somente de Mn^{4+} .

nos ensaios de remoção de Mn^{2+} em meio de cultura (Chang, Tani, Naitou, Miyata e Seyama, 2013).

A oxidação de vários metais é influenciada pelo manganês. Foi observado que As^{3+} oxida a As^{4+} naturalmente na presença dos óxidos de manganês, assim como óxidos de manganês sequestram Co^{2+} de soluções aquosas, transformando em Co^{3+} . Experimentos realizados em meios com óxidos biogênicos de manganês suplementado com íons As^{3+} e Co^{2+} contendo a enzima manganês oxidase mostraram que houve uma oxidação de Co^{2+} e As^{3+} a Co^{3+} e As^{4+} , com conseqüente redução de Mn^{4+} a Mn^{2+} , porém a presença da enzima manganês oxidase reciclou o sistema transformando o manganês reduzido novamente em óxidos de manganês que poderão servir na oxidação de outros íons de As^{3+} e Co^{2+} , formando assim, um sistema independente. Os óxidos de manganês servem como mediadores nos ciclos de vários elementos (Chang, Tani, Naitou, Miyata, Seyama, *et al.*, 2013; Watanabe *et al.*, 2013)

1.6-Bioextração de Manganês

Existem várias espécies de fungos que produzem uma diversidade de ácidos orgânicos e secretam esses ácidos para o ambiente, esses ácidos diminuem o pH do meio e, conseqüentemente, tornam o ambiente redutor, o que culmina na disponibilização dos íons de manganês. Fungos que possuem algum mecanismo que torna possível a oxidação de manganês, também podem reduzir os óxidos biogênicos de manganês produzidos devido à secreção de ácidos orgânicos, essas espécies não são indicadas para o emprego na biorremediação de águas contaminadas apesar de serem importantes no ciclo biogeoquímico do manganês (Burgstaller *et al.*, 1993).

É descrito pela literatura que ácido cítrico, que é produzido por alguns fungos, facilita a redução de óxidos de manganês, assim como quantidades excessivas de ácido oxálico no meio extracelular. *Serpula himantoides* e *Aspergillus niger* reduzem tanto óxidos biogênicos quanto óxidos abióticos de manganês. O óxido de manganês utilizados nesses experimentos foi a birnessita $(Na_{0,3}Ca_{0,1}K_{0,1})(Mn^{4+}Mn^{3+})_2O_4 \cdot 1.5 (H_2O)$ (Wei *et al.*, 2012). *Penicillium citrinum* também demonstrou capacidade de solubilização de óxidos de manganês devido à secreção de ácidos tartárico, cítrico, oxálico e málico, evidenciados por HPLC (Acharya *et al.*, 2003; Mehta *et al.*, 2010).

Várias pesquisas têm como objetivo caracterizar a redução do minério a íons de manganês, identificando quais ácidos secretados pelos fungos melhor contribuem para a

solubilização do metal, selecionar espécies que produzem uma quantidade maior de ácidos e também delinear um processo de bioextração. O intuito de formular um processo de extração de metais alternativo utilizando microrganismos surgiu da necessidade de extrair manganês de minérios que possuem um teor baixo desse metal, onde o processo físico-químico tradicional não é economicamente viável. Esses minérios com baixo teor de manganês representam uma porcentagem significativa do total extraído pela indústria mineradora, e normalmente é descartado, acarretando um prejuízo ambiental e econômico (Acharya *et al.*, 2003).

1.7-Contexto da biorremediação de águas contaminadas com metais

Em relação aos métodos usados para a biorremediação de ambientes contaminados com manganês, a tecnologia de imobilização de células e enzimas tem sido usada, porém são necessários maiores estudos para alcançar um método que explore ao máximo o potencial biotecnológico do microrganismo, ou um ambiente que disponha de condições para ótimo desempenho das enzimas responsáveis pelo processo de oxidação do íon (Luan *et al.*, 2012).

Polissacarídeos também são usados como adsorvente de manganês, ver item 1.3.1, no caso é utilizado quitina e quitosana proveniente de animais marinhos, o mecanismo de adsorção é o mesmo evidenciado em fungos. Existem estudos que citam fungos como fontes promissoras de quitina para a adsorção de metais (Tsekova *et al.*, 2010).

Em muitos casos o organismo, no caso o fungo, não necessita estar vivo para promover a biossorção e adsorção de metais, isso torna a introdução de fungos dotados da capacidade de adsorção mais vantajosos do que fungos que possuam enzimas que oxidam o manganês ou que removam o manganês por mais de um mecanismo, pois assim os custos de manutenção do processo são diminuídos (Sinha e Khare, 2013).

A Tabela 1 mostra os microrganismos que já estão sendo utilizados de alguma forma na biorremoção de manganês, mostra também o meio pelo qual esses microrganismos conseguem remover o íon Mn^{2+} .

Tabela 1: Microrganismos na biorremocção de manganês (Sinha e Khare, 2013).

| Microrganismo | Matriz de imobilização | Eficiência | Mecanismo | Referência |
|--|-------------------------------|-------------------|-----------------------------------|--|
| <i>Phoma</i> sp. | Fibra de carbono | 100% | Precipitação | (Sasaki, 2004) |
| <i>Aspergillus niger</i> | Alginato | 52,3% | Precipitação e adsorção. | (Tsekova <i>et al.</i> , 2010) |
| <i>A. niger</i> | Polivinil álcool hidrogel | 44,6% | Precipitação e adsorção. | (Tsekova <i>et al.</i> , 2010) |
| <i>Chlorella salina</i> | Alginato | 40% | - | (Garnham <i>et al.</i> , 1992) |
| <i>Cyanobacteria</i> | Lã de vidro | 40% | - | (Bender <i>et al.</i> , 2009) |
| <i>Leptothrix discophora</i> | Nódulos Ferromanganês | 90% | Oxidação de manganês e filtração. | (Burgstaller <i>et al.</i> , 1993) |
| Bactéria oxidante de manganês | Cascalho de sílica | 100% | Oxidação de manganês. | (Tekerlekopoulou <i>et al.</i> , 2008) |
| <i>Gallionella</i> e <i>Leptothrix</i> | - | 88% | Oxidação de Mn e filtração | (Pacini <i>et al.</i> , 2005) |
| <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | Amberlita XAD-4 | - | Adsorção e biossorção. | (Baytak e Türker, 2005) |

1.8- Características da água de rejeito usada neste estudo

Este estudo propõe isolar fungos filamentosos oriundos de uma água de rejeito de mina que apresenta 140 mg L⁻¹ de Mn²⁺ solúvel. A coleta da água foi realizada na estação seca, em julho de 2011, em uma mina situada no Quadrilátero Ferrífero em Minas Gerais, Brasil. Esta água possui vários outros íons, a medição desses elementos foi feita por espectrometria de emissão atômica por plasma, Varian 725 ICP OS como mostra a Tabela 2. A concentração dos elementos pode sofrer variações devido à pluviometria.

Desde agosto de 2011 o nosso laboratório vem isolando e caracterizando fungos filamentosos, leveduras e bactérias de água de mina de drenagem que estão envolvidos no processo de oxidação de manganês, as pesquisas integram o Núcleo de Excelência em Manganês (Rede: Grupo de Excelência na Rota de Produção de Minérios de Manganês Brasileiros – Mineração Sustentável VALE/FAPEMIG 2011).

Tabela 2: Elementos presente na água de rejeito de mina e suas concentrações (Silva *et al.*, 2012).

| Parâmetro | Concentração mg/L |
|------------------|--------------------------|
| Ca | 85,6 |
| Mg | 90,0 |
| Na | 4,07 |
| S | 306,0 |
| Ni | 0,62 |
| Zn | 0,78 |
| Cr | 0,05 |
| Cu | 0,22 |
| Fe | 2,20 |
| Mn | 140,0 |
| pH | 6,5 |

2. Objetivos

2.1-Objetivo Geral

Este estudo teve como objetivo geral selecionar fungos filamentosos capazes de remover Mn^{2+} de águas de rejeito de minas, caracterizar o mecanismo de biorremediação de Mn^{2+} e identificar as espécies usando técnicas moleculares.

2.2-Objetivos específicos

- Isolar fungos presentes em águas de rejeito de minas;
- Identificar os isolados pelo sequenciamento e análise filogenética da região ITS ribossômica;
- Avaliar o potencial de biorremediação de Mn^{2+} em ensaios de batelada;
- Avaliar a presença e a atividade de enzimas possivelmente relacionadas a mecanismos de oxidação de Mn^{2+} a Mn^{3+}/Mn^{4+} ;
- Verificar se o manganês removido está localizado no meio extracelular ou adsorvido à parede celular;
- Determinar a natureza do processo de remoção de manganês pelos fungos, ou seja, se a queda da concentração do íon Mn^{2+} observada é atribuída à oxidação ou se ocorreu apenas uma precipitação a carbonato de manganês (Mn^{2+} insolúvel).

3. Materiais e Métodos

3.1- Isolamentos dos fungos

Inicialmente 2 litros de água de rejeito de uma mina localizada no Quadrilátero Ferrífero Minas Gerais, Brasil foram coletados em julho de 2011. A água foi plaqueada em três meios distintos: meio mineral [3,0g/L de NH_4NO_3 , 1,0g/L de KH_2PO_4 , 0,5g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 100,0g/L de sacarose e 15g/L de Agar], ágar batata [extrato de batata/dextrose (2,4% - p/v), extrato de levedura (0,7% - p/v) e 15g/L de Agar], e ágar *Sabouraud* [peptona de caseína (5,0 g/L), peptona de carne (5,0 g/L), glicose (40g/L); pH 5,6 e 15,0 g/L de Agar], em todos os meios foi suplementado 30 μg / mL de cloranfenicol. As placas foram incubadas a 30°C durante 7 dias, a seguir os fungos isolados foram recuperados e preservados em glicerol 15%.

3.2-Extração de DNA genômico pelo método CTAB/NaCl 10%

Foram trituradas separadamente 1,5g das hifas dos cinco fungos numerados como 7, 18, 23, 26 e 31, usando nitrogênio líquido e um pistilo até a obtenção de um pó bem fino ou um líquido bem homogêneo dependendo da consistência da hifa, acrescentando 2,5 mL de tampão de lise (Tris 5mM pH 7,5 -500 μL ; EDTA 1 mM - 20 μL ; N-Lauril Sarcosina 1% 0,1g e água destilada) por uma hora, a 37°C. Logo após, 10 μL proteinase K para cada 250 μL de amostra: 20ng μL^{-1} e as amostras foram deixadas durante a noite a 37°C no banho FRIGOMIX. Foram adicionados 50 μL para cada 250 μL inicial de CTAB/NaCl 10% v/v e incubados a 65°C por 20 minutos. Adicionados igual volume de clorofórmio, e homogeneizados com vórtex CERTOMAT MV e centrifugados por 10 minutos a 12000 rpm na microcentrífuga vision VS15000CFN. Foram transferidos 300 μL de sobrenadante para um novo tubo com 825 μL de etanol, 30 μL de acetato de sódio e colocado a -20°C por 3 horas e centrifugadas a 12000 rpm por 10 minutos. O precipitado foi lavado com álcool 70% e centrifugado em 12000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em 30 μL de água estéril e o DNA hidratou durante a noite. Um gel de agarose 0,6% foi feito para verificar a presença de DNA genômico usando 5 μL das amostras resultantes da extração (Sambrook *et al.*, 1989). O DNA foi dosado usando 1 μL com o auxílio do equipamento NanoVue GE e foram selecionadas as amostras com maior

concentração e com banda mais visível no gel 0,6% da extração visualizado no transiluminador Vilber Lourmat.

3.3-Amplificação da região ITS1 e ITS2 e da região 18S ribossomal utilizando PCR

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi realizada seguindo uma desnaturação inicial a 94°C por 12 minutos e 30 ciclos de 30 segundos de desnaturação a 94°C, a temperatura de anelamento que é distinta para cada iniciador por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto e 30 segundos, após os ciclos 72°C por 7 minutos no termociclador Biocycler, (Takano *et al.*, 2006). Para obter um volume satisfatório de *amplicons* e para certificar que os produtos obtidos eram reprodutíveis, foram realizadas três reações para todos os iniciadores usando o kit Fermentas de acordo com a Tabela 3.

Tabela 3: Reagentes empregados na PCR (Kit Fermentas)

| Reagentes | Volume |
|---|---------------|
| DNA (50 ng *) | 2µL |
| Mix de iniciadores 10µmol | 1 µL |
| Tampão de PCR NH ₄ SO ₃ | 2,5 µL |
| MgCl ₂ 25 mM | 2 µL |
| dNTP 10 mM | 0,5 µL |
| Taq DNA Polimerase | 1 µL |
| Água estéril | 16 µL |
| Volume total | 25 µL |

3.3.1-Iniciadores

Foram selecionados da literatura os iniciadores ITS4 e ITS5 para a amplificação como mostra a Tabela 4 (Gardes e Bruns, 1993). Estes iniciadores foram usados anteriormente com sucesso em estudos moleculares de fungos relacionados ao metabolismo de manganês nos trabalhos de análise filogenética de Takano *et al.* (2006) e em estudos de oxidação de

Mn²⁺ (Santelli *et al.*, 2010), a Figura 5 mostra o posicionamento dos iniciadores no segmento intergênico ao longo da região ribossomal.

Para verificar se houve amplificação, foram realizados géis de agarose a 1,2%, utilizando 4 µL da reação e o padrão GelPilot 100 pb Qiagen e Invitrogen plus Ladder 1Kb. Os amplicons foram visualizados com auxílio de um transiluminador Vilber Lourmat e a imagem captada com auxílio do sistema.

Tabela 4: Iniciadores utilizados na PCR

| Iniciador | Temperatura |
|---|-------------|
| ITS5: GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G (F) ITS4: TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC (R) | 54°C |
| NS1: GTA GTC ATA TGC TTG TCT C (F) NS2: GGC TGC TGG CAC CAG ACT TGC (R) | 53°C |

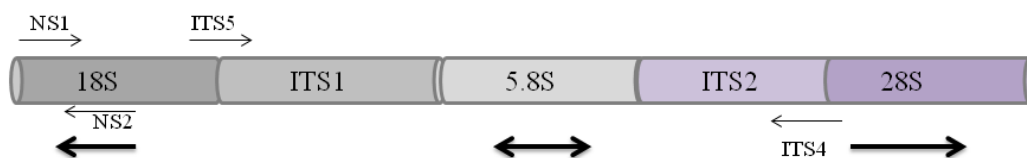


Figura 5: Posição de anelamento dos iniciadores na região ITS: Região amplificada pela reação de PCR.

3.4-Purificação dos produtos de PCR

Foram adicionados 10 µL de acetato de sódio 3M, pH 7.0 a 100 µL de produto de PCR, 250 µL de etanol absoluto, posteriormente as amostras foram mantidas a -20°C por 30 minutos. Decorrido esse intervalo de tempo, as amostras foram centrifugadas a 10000 rpm por 10 minutos. Ao precipitado foi adicionado 1 mL de etanol 70% e o DNA recuperado por centrifugação 5 minutos a 10000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o DNA seco no fluxo laminar e ressuspendido em 50 µL de água estéril. 4 µL foram usados para análise no gel a 1,2% de agarose em TBE 0,5% e 3 µL de brometo de etídeo (1µg mL⁻¹). Como marcador de massa molecular foi utilizado 3 µL de padrão GelPilot 100 pb Qiagen e Invitrogen plus Ladder 1Kb. Após 1 hora de corrida os produtos foram visualizados no transiluminador Vilber Lourmat.

3.5 - Identificação Molecular

Os fragmentos de DNA purificados foram sequenciados utilizando o método de Sanger e Coulson (1975). Esta etapa do projeto foi realizada pela empresa HELIXXA. Foram sequenciadas três amostras no sentido *forward* e três no sentido *reverse*, para a obtenção de uma boa sequência consenso.

As amostras foram submetidas ao alinhamento global através da ferramenta disponível em ClustalW, <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>, para obtenção da sequência consenso de cada isolado. O consenso obtido foi submetido a uma busca por similaridades de nucleotídeos com uso do algoritmo BLASTn disponível em (www.ncbi.nlm.nih.gov).

A análise filogenética foi realizada pelo método de distância, utilizando o algoritmo *Neighbor-Joining*. A árvore filogenética consenso foi construída utilizando a análise de *bootstrap* de 2000 réplicas e visualizada com o auxílio do programa Figtree 1.4.2, disponível em <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>.

3.6-Ensaio para avaliação do potencial de remoção de Mn^{2+} solúvel em meio de cultura

Foram feitos dois ensaios de biorremoção de manganês, um com 140 mg L^{-1} de Mn^{2+} e outro com 50 mg L^{-1} de Mn^{2+} (Sasaki, 2008). Os fungos previamente isolados como descrito no item 3.1 foram inoculados em frascos contendo 150 mL de Caldo *Sabouraud* pH 7,0, 140 ou 50 mg L^{-1} de Mn^{2+} suplementado com $100\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ de ampicilina, o ensaio foi realizado em triplicatas para ambos os fungos. Para avaliar a remoção química, foi utilizado um frasco nas mesmas condições, porém sem adição de inóculo. O experimento foi monitorado semanalmente para verificar possível contaminação.

O ensaio de oxidação biológica do manganês foi realizado durante 35 dias. Uma vez por semana eram retirados 1,5 mL de meio de cultivo e o pH era medido. Os frascos eram pesados antes da retirada das amostras semanais e a água evaporada era repostada, após a retirada da amostra semanal de 1,5 mL o frasco foi novamente pesado. As amostras foram armazenadas a -20°C até serem analisadas por espectrometria de emissão atômica por plasma (Varian 725). As amostras foram centrifugadas a 12000 rpm por 10 minutos antes de serem diluídas (10X) e submetidas a espectrometria (Varian 725 ICP-OS).

3.7-Ensaio para avaliação do potencial de redução de MnO₂ insolúvel em meio de cultura

Os fungos previamente isolados como descrito no item 3.1 foram inoculados em frascos contendo 150 mL de Caldo *Sabouraud* pH 7,0, 140 mgL⁻¹ de Mn⁴⁺ suplementado com 100 µg mL⁻¹ de ampicilina, o ensaio foi realizado em triplicatas para ambos os fungos. Para avaliar a remoção química, foi utilizado um frasco nas mesmas condições, porém sem adição de inóculo. O experimento foi monitorado semanalmente para verificar possível contaminação.

O ensaio de redução biológica do manganês bem como as dosagens foram realizadas durante 35 dias nas mesmas condições descritas acima (item 3.6.).

3.8-Ensaio da Atividade da Lacase em placa

Para detectar a presença de lacases extracelulares, que podem estar envolvidas nos processos de remoção de Mn²⁺, foi realizado um ensaio qualitativo em placas com os fungos 7, 18, 23, 26 e 31 conforme descrito por Hartikainen *et al.* (2013). Neste experimento, a presença da lacase extracelular seria identificada pela oxidação do substrato ABTS, 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolína-6- ácido sulfônico). Neste ensaio também é possível observar a aumento da coloração azul no meio ao decorrer do crescimento do fungo. Foram preparadas 12 placas de Agar *Sabouraud* pH 7.0: 5 placas com repiques dos fungos 7, 18, 23, 26 e 31 suplementadas com 140 µg mL⁻¹ de Mn²⁺, 5 placas com repiques dos mesmos fungos porém sem manganês, 1 placa controle com 140 µg mL⁻¹ de Mn²⁺, 1 placa controle sem Mn²⁺, em todas as placas foi adicionado 100 µg mL⁻¹ de ampicilina e 5mM de ABTS.

3.9-Ensaio da atividade da lacase em diferentes concentrações de proteína

3.9.1-Extrato Bruto

Este ensaio foi realizado com as amostras que foram positivas para a presença de lacases no ensaio qualitativo em placa. O ensaio de remoção de Mn²⁺ em meio líquido mostrou maior queda na concentração do manganês solúvel com duas semanas de cultivo,

então, foram crescidos fungos em placas de petri até completar 15 dias e o meio de cultura sólido foi utilizado para preparo dos extratos.

Foram crescidas 6 culturas de fungos em placas de Agar *Sabouraud* com 100µg mL⁻¹ de ampicilina. Cada cepa fúngica foi cultivada na presença e na ausência de 140µg mL⁻¹ de Mn²⁺, foi obtido 6 extratos brutos: 18, 18Mn, 23, 23Mn, 31 e 31Mn. A massa de fungos foi retirada, o meio sólido foi macerado e foi adicionado tampão acetato 50mM pH 5.5, Tween 80 0.1g/L. Posteriormente as amostras foram agitadas 120 rpm por 4 horas no shaker Innova 44 New Brunswick Scientific, filtradas em Whatman n° 1 e foi adicionado 5g/L de PVP. As amostras foram novamente agitadas a 27°C 120rpm por 1 hora e submetidas a filtração no Whatman n° 1 e então armazenadas a -20°C (Pant e Adholeya, 2007). Foi feita a dosagem de proteínas usando o kit BCA (ácido bicinconínico) Sigma.

3.9.2-Reação de atividade enzimática

A atividade da lacase foi testada utilizando o ABTS 0.5mM como substrato e a solução tampão acetato de sódio 0.1 M pH 3.8, pois o substrato funciona em pH ácido. Foram feitas reações com 50, 100 e 200µg mL⁻¹ de proteína para os extratos brutos dos fungos, 18, 18Mn(crescido na presença de Mn²⁺- 140µg mL⁻¹), 23, 23Mn, 31 e 31Mn. As amostras foram incubadas no banho Frigomix 40°C por 1 hora. A absorbância das amostras foi medida no espectrofotômetro a 420nm (Tavares *et al.*, 2013).

Após a medição da absorbância das reações, foi calculado a atividade da enzima em U/mL. Foi utilizada a fórmula abaixo considerando o coeficiente de extinção molar (ε), o tempo em segundos, a absorbância e a quantidade de proteína usada.

$$\frac{U}{mL} = \frac{\Delta Abs. 60. [proteina]. 10^3}{\epsilon}$$

3.10-Identificação morfológica dos fungos

3.10.1-Microcultivo

Foram realizados microcultivos para os oito fungos em estudo com a finalidade de detectar a morfologia microscópica e comparar se os gêneros visualizados correspondem

aos obtidos no ensaio molecular. Os materiais usados foram: alça de platina em gancho, placas de Agar *Sabouraud* dividido em cubos, placas de petri estéreis para microcultivo contendo lâmina silanizada, algodão umedecido com água destilada estéril, pinça, culturas dos diferentes fungos filamentosos. Foi colocado sobre a lâmina, dentro da placa de Petri, Agar *Sabouraud* com o auxílio de pinça ou da própria alça e fragmento do fungo filamentoso semeando nos 4 cantos dentro da placa, um algodão hidrófilo, que foi umedecido com água destilada estéril para criar uma câmara úmida. As oito amostras foram incubadas na estufa a 28°C durante quinze dias para o crescimento das hifas e preparação das lâminas a serem submetidas a microscopia eletrônica de varredura e EDS.

3.10.2-Preparação das lâminas

O cubo de Agar foi removido da lâmina e foi adicionado o tampão fosfato 0,1M pH 7,2 contendo 1% de paraformaldeído e 2% de glutaraldeído por 2 horas para fixar as hifas na lâmina. As hifas foram lavadas com 1mL de água destilada e desidratadas em série de etanol (30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95% e 100%) por 5 minutos cada (Nguyen *et al.*, 2001). As células foram revestidas com ouro para condução elétrica (Q150R ES, Quorum).

3.10.3- Microscopia eletrônica de Varredura – MEV

O procedimento foi realizado no NanoLab RedeMat, localizado na Escola de Minas, UFOP, aparelho Vega3 Tescan. As amostras revestidas com ouro foram inseridas na câmara de vácuo do microscópio, onde a amostra é submetida aos feixes de elétrons.

A MEV detecta sinal de elétrons secundários (SE) e elétrons retroespalhados (BSE). Os BSE incidem em vários ângulos por isso a imagem não tem muito contraste, é utilizado nas análises de EDS. Os SE de diferentes energias emitidos pela amostra são coletados, então é formada uma imagem da superfície da amostra, eles são provenientes das camadas mais superficiais da amostra que estão fracamente ligadas ao núcleo.

Ambos os sinais coletados exibem uma imagem do contorno da superfície, como uma imagem de topografia, porém o sinal dos elétrons secundários é superficial e o sinal dos elétrons retroespalhados é mais profundo (Egerton, 2005).

3.10.4- EDS: Espectroscopia de energia dispersiva

É a técnica analítica que possibilita a análise de elementos e caracterização química de amostras, essa ferramenta permite o conhecimento de quais elementos estão presentes em uma amostra e fornece também uma noção de quais deles são mais abundantes, é uma técnica qualitativa. Neste trabalho, o aparelho de EDS utilizado foi a Oxford que está acoplado ao microscópio eletrônico de varredura, e a análise foi feita com a incidência de elétrons retroespalhados.

A interação entre a amostra e o feixe do aparelho que pode ser carregado com elétrons, prótons ou feixe de raios-X fornece a identificação do elemento. O evento ocorre quando o feixe incide sobre a camada mais interna de elétrons dos elementos presentes na amostra, esse elétron que é de baixa energia, é arrancado da amostra, fica um espaço no local, esse espaço é preenchido com elétrons da camada superficial, que é de alta energia. Essa diferença de energia pode ser emitida como raios-X, cada elemento possui uma emissão.

Também é possível obter com o aparelho um mapeamento da composição de elementos da região selecionada da amostra, esse mapeamento fica mais confiável quanto maior o tempo de exposição à análise (Egerton, 2005).

3.11-Ensaio para detecção da presença de manganês oxidado – Azul de leucoberbelina (LBB)

A solução estoque de azul de leucoberbelina (N.N'-Dimetilamino-p,p'-trifenilmetano-o"- ácido sulfônico) foi feita adicionando 100mg do pó do reagente a 2mL de água destilada acidificada com ácido fosfórico PA, posteriormente foram adicionados 7.3µL de solução concentrada de NH₄OH, o volume foi completado até 2.5mL (solução 4%) (Krumbein e Altmann, 1973).

3.11.1- Preparo da solução de reação – LBB

Foram utilizados 26 µL de ácido acético glacial PA, 100µL de solução estoque de LBB preparada anteriormente e o volume foi completado para 10 mL. Essa solução foi utilizada tanto no ensaio em placa como no ensaio feito com precipitados (Yang *et al.*, 2013)

3.11.2- Reação LBB

Como descrito no item 3.6, amostras com volume de 1.5 mL de meio foram recolhidas semanalmente para a dosagem no espectrofotômetro emissão atômica em plasma Varian 725 ICP-OS; as amostras semanais foram centrifugadas antes da diluição e o sobrenadante foi separado usado na dosagem de Mn^{2+} , o precipitado restante foi utilizado na reação com LBB, para detectar se existem Mn^{3+} ou Mn^{4+} no meio de cultura. Foram utilizados 20 µL de meio de cultura, 100 µL de solução de reação LBB (0,004%) e 80 µL de água estéril.

4. Resultados e Discussão

4.1- Isolamentos dos fungos

Um dos objetivos deste trabalho é conhecer a composição de fungos filamentosos presentes nas águas de rejeito da mineração, no estado de Minas Gerais. Atualmente poucos estudos no Japão e nos Estados Unidos têm encontrado resultados promissores com o uso de fungos filamentosos na oxidação de manganês visando a biorremediação de águas contaminadas com metais, principalmente as águas provenientes do processo de mineração (Miyata *et al.*, 2006; Santelli *et al.*, 2010).

Resultados anteriores de isolamento de microrganismos do nosso laboratório são mostrado na Tabela 5. Esses microrganismos foram isolados da água de rejeito de mina que apresentava 140 mg L^{-1} (2.5mM) de Mn^{2+} , pH 6.5. Estes isolados foram inoculados em diferentes meios, o Agar batata, Agar *Sabouraud* e Agar meio mineral. Foram encontrados 31 fungos, porém foram selecionados 5 para a caracterização feita neste trabalho. O critério para seleção foi usar isolados mais distintos uns dos outros e que mais removeram Mn^{2+} do meio caldo *Sabouraud* com uma concentração inicial de 50 mg L^{-1} em um ensaio preliminar em duplicatas (dados não mostrados).

Foram utilizados vários meios para o isolamento dos microrganismos como estratégia para obtermos o máximo possível de isolados, meios como o agar batata favorecem a esporulação de fungos, facilitando a visualização da morfologia (Santelli *et al.*, 2010). Acharya *et al.* (2003) usou meio mineral para realizar experimentos de redução de minérios de Mn com *Penicillium citrinum* com o objetivo de padronizar a biolixiviação de manganês para a indústria mineradora. O *Sabouraud* foi utilizado por ser um meio rico, então os microrganismos cresceriam em um tempo menor pela abundância de nutrientes.

Assim como neste estudo, Takano *et al.* (2006) também isolaram espécies de fungos de um ambiente aquático com 3 mg L^{-1} de Mn^{2+} , no Japão. Eles obtiveram três isolados de fungos, os gêneros foram identificados como *Coniothyrium* sp., *Paraconiothyrium* sp. e *Phoma* sp. em Agar extrato de levedura-peptona suplementado com Mn^{2+} . Posteriormente o mesmo grupo encontrou mais cinco isolados no mesmo local usando outro meio, o AY (Miyata *et al.*, 2006).

Santelli *et al.* (2010) também isolaram microrganismos oriundos de águas de drenagem de mina rica em Mn (46 a 119 mg L^{-1} de Mn^{2+}). A mina era de carvão nos Estados Unidos, porém as águas dessa mina apresentam pH ácido. Eles isolaram quatro

gêneros de bactérias, *Pseudomonas* sp., *Flavobacterium* sp., *Agrobacterium* sp. e *Bacillus* sp. Eles também isolaram 9 gêneros de fungos, *Plectosphaerella cucumerina*, *Microdochium bolleyi*, *Stilbella aciculosa*, *Pyrenochaeta* sp., *Stagonospora* sp., *Alternaria alternata*, *Acremonium strictum*, *Pithomyces chartarum* e *Phoma* sp. Foram usados 6 tipos de meios diferentes (AY, meio K, meio J, J suplementado com acetato, meio M e meio simulando água de mina), nenhum deles coincidiu com os meios usados neste estudo.

Diante desses fatos podemos perceber que, se nenhum isolado foi omitido dos estudos citados acima, o isolamento feito neste estudo contemplou uma grande quantidade de microrganismos usando apenas 3 tipos de meios diferentes. Os isolados encontrados apresentam grandes indícios de serem de espécies diferentes devido a diferença morfológica observada no mesmo meio de cultura, como podemos ver na Figura 6. Não existem grupos de pesquisa no Brasil que já publicaram algum estudo de isolamento de microrganismos com fim de biorremediação de águas contaminadas com Mn.

Em relação à tolerância desses microrganismos em concentrações altas de Mn^{2+} , Anahid *et al.* (2011) cresceram *Aspergillus niger*, *Aspergillus foetidus* e *Penicillium simplicissimum* em 5000, 3500 e 6000 ppm de Mn^{2+} em meio sólido, respectivamente. Os fungos que Anahid *et al.* (2011) testaram eram provenientes de um banco fornecedor de fungos. Essa concentração é bem maior do que a concentração da água da mina deste estudo e também do meio em que os fungos deste estudo cresceram.

Tabela 5: Microrganismos encontrados na água de rejeito de mina com $140mg L^{-1}$ de Mn^{2+} .

| Fungos Filamentosos | | | Bactérias | | Leveduras |
|---------------------|--------|---------|--|-------|-----------|
| Meios | | | Isolados dos Meios <i>Sabouraud</i> , Batata e Mineral e YPD | | |
| | | | Classificação | | 8 |
| | | | Bacilos | | |
| <i>Sabouraud</i> | Batata | Mineral | Gram+ | Gram- | |
| 10 | 10 | 11 | 3 | 2 | |
| Sub-total | 31 | | 5 | | 8 |
| Total | 44 | | | | |

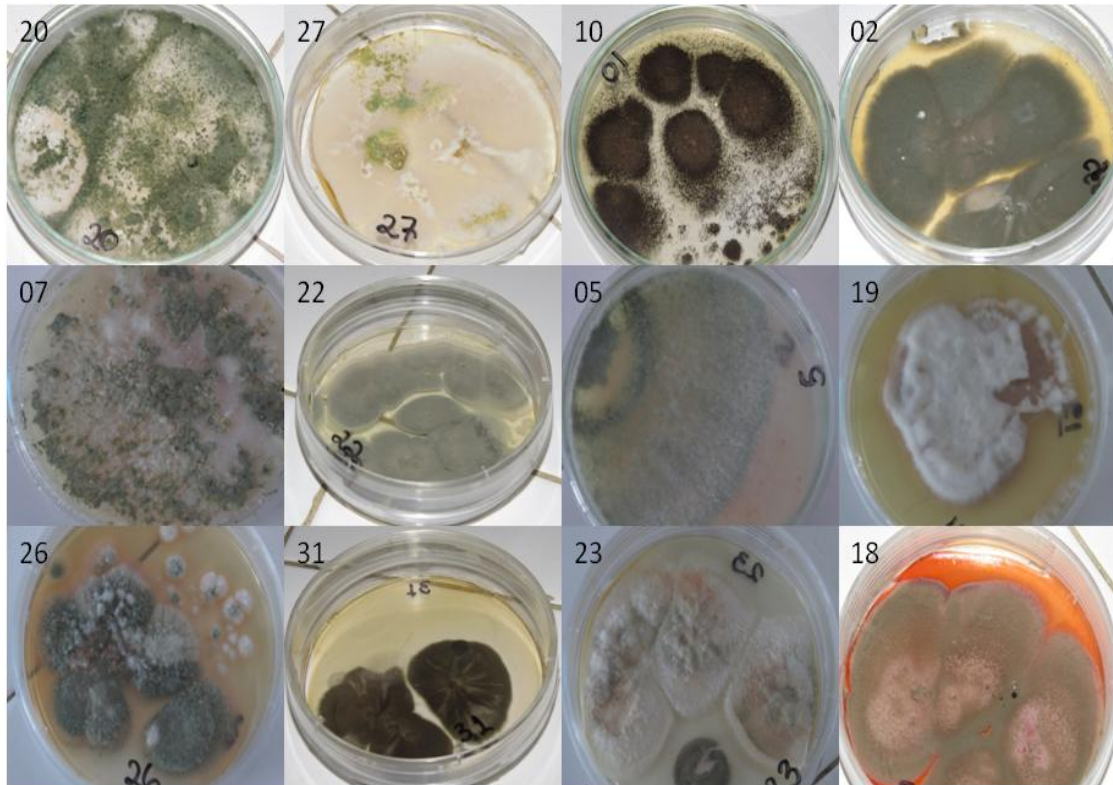


Figura 6: Fungos isolados da água de rejeito de mina: aspectos morfológicos das culturas fúngicas em Agar *Sabouraud*, com a numeração do isolamento.

4.2-Extração de DNA genômico pelo método CTAB/NaCl 10%

Na Figura 7, podemos verificar que a metodologia utilizada para a extração de DNA genômico foi eficiente. A quantificação do DNA extraído foi feita com auxílio de espectrometria (Nanoview - GE) mostrou que a concentração das preparações variou de 100 a 300 ng/ μ L, rendimento suficiente para a reação de PCR. Foram realizadas três extrações de DNA independentes, a figura 6 mostra o gel de uma das extrações.

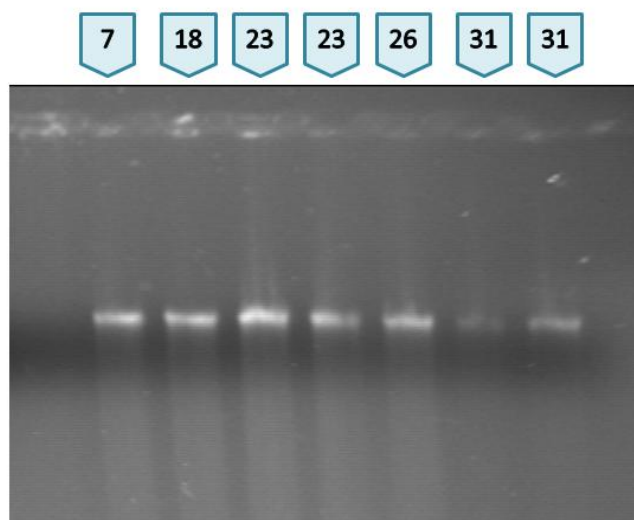


Figura 7:Análise da qualidade do DNA genômico: Cerca de 5 μ g de DNA genômico foram analisados em gel de agarose 0,6%, conforme descrito em Materiais e Métodos 3.2. O brometo de etídeo foi o corante intercalante de DNA utilizado para a visualização da amostra, com a incidência da luz UV no gel podemos visualizar a banda de DNA.

4.3-Amplificação da região ITS1 e ITS2 e 18S ribossomal utilizando PCR

Utilizando o par de iniciadores ITS5 (*Forward*) e ITS4 (*Reverse*), foi possível obter bandas que possuíam cerca de 600pb e um subproduto de 400pb que amplifica a região ITS ribossomal. Utilizando o par de iniciadores NS1/ NS2 que amplifica a região 18S ribossomal, foi obtido um produto de 800pb. Na Figura 8 podemos ver um gel de produto de PCR não purificado. Para obtermos um sequenciamento de qualidade é necessário purificar os produtos de PCR.

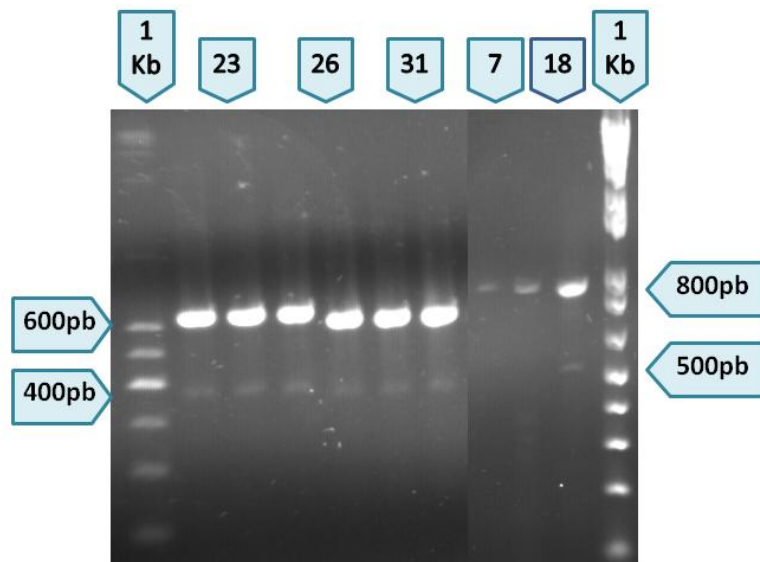


Figura 8: Análise dos amplicons utilizando o par de iniciadores ITS4/ITS5 e NS1/NS2- Três μL da reação de PCR foram analisados em gel de agarose 1,2%: A figura mostra a análise em duplicata para as amostras 23, 26 e 31 (1Kb Qiagen - ITS4/ITS5). A figura também mostra à direita as amostras 7 e 18 (Invitrogen plus Ladder - NS1/NS2).

4.4-Purificação dos produtos de PCR

A seguir, os *amplicons* obtidos utilizando os iniciadores ITS4/ITS5 e NS1/NS2 foram purificados, conforme descrito em Materiais e Métodos (item 3.4). A Figura 9 mostra a integridade e pureza das amostras purificadas. Posteriormente 3 μL destas preparações foram utilizadas para a preparação do gel de agarose 1.2%. Os *amplicons* purificados possuem a mesma massa dos apresentados na Figura 8. Foram feitas 3 purificações independentes para cada isolado, essas amostras foram enviadas para sequenciamento, para obtermos um consenso a ser submetido a análise filogenética.

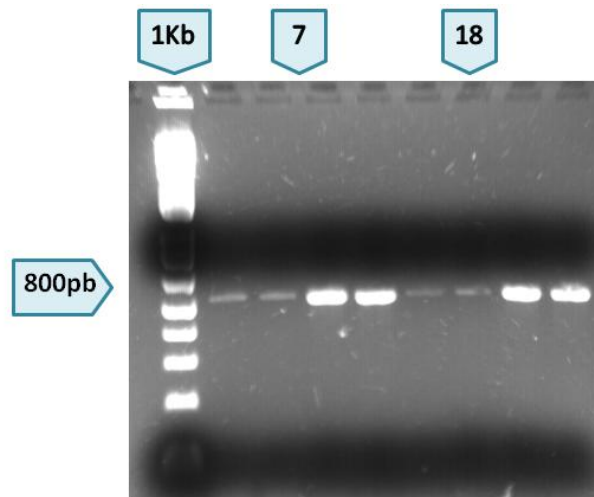


Figura 9: Análise dos amplicons purificados utilizando o par de iniciadores NS1/NS2- Três μ L da reação de PCR foram analisados em gel de agarose 1,2%. Como padrão de massa molecular, foi utilizado o 1Kb Invitrogen Plus Ladder.

4.5-Identificação Molecular

As amostras correspondentes de cada isolado foram sequenciadas, foram obtidas 3 sequências *forward* e 3 *reverse*, as sequências foram analisadas com o auxílio da ferramenta de alinhamento de múltiplas sequências ClustalW. A Figura 10 mostra as sequências de cada isolado alinhadas. Foi obtido um consenso de 638 pb para o isolado 7, 607pb para o isolado 18, 537pb para o isolado 26 e 531pb para o isolado 31. O isolado 23 apresentou uma sequência com muitas bases indeterminadas, não foi possível conseguir uma sequência confiável, para esse isolado não será possível fazer a identificação molecular.

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```

Renata_31B_ITS5      -CKGGGKAAMCTGCGGGRGGGWCATTACAAGTTGACCCCGGCCCTCGGGCCGGGATGTTC 59
Renata_31A_ITS5      CRRKGGKKKACTGCGG-AGGGWCATTACAAGTTGACCCCGGCC-TCGGGCCGGGATGTTC 58
Renata_31C_ITS5      ----TKKRGA CTGCGR---GGWCATTACAAGTTGACCCCGGCCCTCGG---GSGRAGTTC 50
                    *   * * * * *   * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Renata_31B_ITS5      ACAACCCTTGTGTCCGACTCTGTGKCCTCCGGGGCRACCCTGCCTCCGGGSGGGGGCC 119
Renata_31A_ITS5      ACAACCCTTGTGTCCGACTCTGTGKCCTCCGGGGCRACCCTGCCTCCGGGCGGGGGCC 118
Renata_31C_ITS5      ACAACCCTTGTGTCCGACTCTGTGKCCTCCGGGG-GACCCTGCCTCCGG--GGGGCC 107
                    * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Renata_31B_ITS5      CCGGRTGGACACTTCAAAC TCTTGCGWAAC TTTGCAGYCKGAGTAAATTTAATTAATAAA 179
Renata_31A_ITS5      CCGGRTGGACACTTCAAAC TCTTGCGWAAS TTTGCAGTCTGAGTAAATTTAATTAATAAA 178
Renata_31C_ITS5      C--GGKGGACACTTCAAAC TCTTGCGTAA YTTTGCRCGYCTGAGWAA-TTTAATTAATAAA 164
                    * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```



```

Renata_31B_ITS5      TTAAAACTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGG-CATCGATGAAGAACGCAGCGAAATG 238
Renata_31A_ITS5      TTAAAACTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGG-CATCGATGAAGAACGCAGCGAAATG 237
Renata_31C_ITS5      TTAAAACTTCAACAASGGATCTYTTGKTTCTGGGMATCGATGAAGAACGRCGCGAAATG 224
*****
Renata_31B_ITS5      CGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCG 298
Renata_31A_ITS5      CGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCG 297
Renata_31C_ITS5      CRATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTTRAACGCACATTGCC 284
*****
Renata_31B_ITS5      CCCCTGGTATTCCGGGGGCGATGCCTGTTCGAGCGTCATTTCACTCAAGCCTCGCT 358
Renata_31A_ITS5      CCCCTGGTATTCCGGGGGCGATGCCTGTTCGAGCGTCATTTCACTCAAGCCTCGCT 357
Renata_31C_ITS5      CCCCTG-TATTC-GGGGGSATGC-TGTTGAGCGWCATTCC-CCACTCAAGCCTCGY 340
*****
Renata_31B_ITS5      TGGTATTGGGCGACGCGGTCCGCCGCGSGCCTCAAATCGACCGGCTGGGTCTTCCGTCCC 418
Renata_31A_ITS5      TGGTATTGGGCGACGCGGTCCGCCGCGSGCCTCAAATCGACCGGCTGGGTCTTCCGTCCC 417
Renata_31C_ITS5      TGKTATRGGGCGA---GGKSCCC-CGCGKSCARAAAYCRCCGGGTGS-TCTCCGYYCY 395
** ** *
Renata_31B_ITS5      CTCAGCGTTGTGAAACTATTCGCTAWAGGGTGCCGCGGAGGTCACGCCCARAACAAC 478
Renata_31A_ITS5      CTCAGCGTTGTGAAACTATTCGCTAWAGGGTGCCGCGGAGGTCACGCCCARAACAAC 477
Renata_31C_ITS5      CTS-GCGGTG-RGAAWCTATTC---ATARGGGMC-CRGGGWKACGCS--MAAACACC 447
** *
Renata_31B_ITS5      CCCATTTCTAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAAGTAAAGCATATCAA 538
Renata_31A_ITS5      CCCATTTCTAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAAGTAAAGCATATCAA 537
Renata_31C_ITS5      C---TTTYTA--KTGTCT----GKCWCRKGRGGWCCCTS----RSATTSRSAWA-CAW 493
* * *
Renata_31B_ITS5      TAAG-CGGAGGAA 550
Renata_31A_ITS5      TAAGCGGARGAA 550
Renata_31C_ITS5      WW----SGAKAMA 502
** *

```

Figura 10: Alinhamento Global: Foram utilizadas 3 sequências para a obtenção do consenso do isolado 7, 18, 23, 26 e 31, utilizando o alinhamento global CLUSTALW. A figura mostra o alinhamento das sequências correspondentes ao isolado 31 *Forward*, as demais encontram-se em anexo.

Em seguida, a sequência consenso foi submetida ao alinhamento local no BLASTn, onde foram selecionados os organismos com *e-value* de 0 e identidade >85%. As sequências desses organismos foram então recuperadas para a construção da árvore filogenética. Para a sequência 7 como mostra a Tabela 6, foram recuperadas muitas espécies do gênero *Hypocrea* e *Trichoderma*, que representa muitas vezes a mesma espécie. Por exemplo, *Hypocrea jecorina* é o mesmo que *Trichoderma reesei*, *Hypocrea* é a designação que se dá ao fungo em estado teleomorfo (apresentando estruturas reprodutivas assexuadas conídios), *Trichoderma* é a designação que é dada ao fungo em estado anamorfo (sem as estruturas de reprodução) (Jaklitsch, 2009).

Tabela 6: Alinhamento local Blast utilizando a sequência do consenso 7 com as sequências depositadas no banco de dados NCBI.

| Espécie (número de acesso) | <i>E-value</i> | Identidade |
|---|-----------------------|-------------------|
| Uncultured soil basidiomycete (AJ515937.1) | 0,0 | 97% |
| Uncultured soil ascomycete (AJ515930.1) | 0,0 | 97% |
| <i>Hypocrea jecorina</i> (JN831373.1) | 0,0 | 100% |
| <i>Hypocrea nigricans</i> (JN941681.1) | 0,0 | 100% |
| <i>Hypocrea gelatinosa</i> (JN941689.1) | 0,0 | 99% |
| <i>Trichoderma viride</i> (FJ598872.1) | 0,0 | 99% |
| <i>Hypocrea lutea</i> (JN941686.1) | 0,0 | 99% |
| <i>Hypocrea minutispora</i> (JN941685.1) | 0,0 | 99% |
| <i>Hypocrea lactea</i> (JN941688.1) | 0,0 | 99% |
| <i>Hypocrea pulvinata</i> (JN941674.1) | 0,0 | 99% |
| <i>Hypocrea koningii</i> (HM152770.1) | 0,0 | 99% |
| <i>Hypocrea rufa</i> (AJ301991.1) | 0,0 | 99% |
| <i>Hypocrea muroiana</i> (JN941682.1) | 0,0 | 99% |
| <i>Hypocrea sulphurea</i> (JN941671.1) | 0,0 | 99% |
| <i>Trichoderma koningiopsis</i> (JQ278020.1) | 0,0 | 99% |
| Uncultured Pezizomycotina (EU647003.1) | 0,0 | 99% |
| <i>Podostroma cordyceps</i> (AY245667.1) | 0,0 | 99% |
| <i>T.deformans</i> (X69852.1) | 0,0 | 99% |
| <i>Hypocrea schweinitzii</i> (L36986.1) | 0,0 | 99% |
| <i>Trichoderma longibrachiatum</i> (AJ810427.1) | 0,0 | 99% |
| <i>Aphysiosstroma stercorarium</i> (U32398.1) | 0,0 | 99% |
| <i>Paecilomyces variotii</i> (JN939029.1) | 0,0 | 99% |
| <i>Hypocrea lixii</i> (JN939041.1) | 0,0 | 100% |

Para a sequência 18 foram recuperadas muitas espécies do gênero *Penicillium* como mostra a Tabela 7.

Tabela 7: Alinhamento local Blast utilizando a sequência do consenso 18 com as sequências depositadas no banco de dados NCBI.

| Espécie (Número de acesso) | E-value | Identidade |
|---|----------------|-------------------|
| <i>Penicillium</i> sp. (KF954542.1) | 0,0 | 99% |
| <i>Penicillium</i> sp. (KF952244.1) | 0,0 | 99% |
| <i>Penicillium</i> sp. (KC845563.1) | 0,0 | 99% |
| <i>Penicillium</i> sp. (KC405608.1) | 0,0 | 99% |
| <i>Penicillium purpurogenum</i> (KC143068.1) | 0,0 | 99% |
| <i>Talaromyces purpurogenus</i> (KC009578.1) | 0,0 | 99% |
| <i>Penicillium pinophilum</i> (JN222360.1) | 0,0 | 99% |
| <i>Talaromyces flavus</i> var. <i>flavus</i> (GU733356.1) | 0,0 | 99% |
| <i>Acremonium cellulolyticus</i> (AB474750.1) | 0,0 | 99% |
| <i>Penicillium purpurogenum</i> (GQ903331.1) | 0,0 | 99% |
| <i>Penicillium purpurogenum</i> (DQ365947.1) | 0,0 | 99% |
| <i>Penicillium rugulosum</i> (EU263610.1) | 0,0 | 99% |
| <i>Penicillium purpurogenum</i> (AF245268.1) | 0,0 | 99% |
| <i>Talaromyces flavus</i> (M83262.1) | 0,0 | 99% |
| <i>Penicillium piceum</i> (GU477623.1) | 0,0 | 99% |
| <i>Penicillium funiculosum</i> (AF245267.1) | 0,0 | 99% |
| <i>Paecilomyces aeruginus</i> (AB023942.1) | 0,0 | 99% |
| <i>Aphanoascus cinnabarinus</i> (AY526483.2) | 0,0 | 99% |
| <i>Penicillium purpurogenum</i> (AF245264.1) | 0,0 | 99% |
| <i>Penicillium purpurogenum</i> (AF245257.1) | 0,0 | 99% |
| <i>Penicillium purpurogenum</i> (AF245244.1) | 0,0 | 99% |
| <i>Penicillium purpurogenum</i> (AF245231.1) | 0,0 | 99% |

Para a sequência 26 foram recuperadas muitas espécies do gênero *Aspergillus* como mostra a Tabela 8 e principalmente da espécie *Aspergillus versicolor*.

Tabela 8: Alinhamento local Blast utilizando a sequência do consenso 26 com as sequências depositadas no banco de dados NCBI.

| Espécie (Número de acesso) | <i>E-value</i> | Identidade |
|--|-----------------------|-------------------|
| <i>Aspergillus</i> sp. (HM535361.1) | 0,0 | 99% |
| <i>Aspergillus</i> sp. (GQ169471.1) | 0,0 | 99% |
| <i>Aspergillus</i> sp. (GQ169463.1) | 0,0 | 99% |
| <i>Aspergillus versicolor</i> (HQ285619.1) | 0,0 | 99% |
| <i>Aspergillus</i> sp. (GQ169467.1) | 0,0 | 99% |
| Fungal endophyte (EU686801.1) | 0,0 | 99% |
| <i>Aspergillus versicolor</i> (AY373883.1) | 0,0 | 99% |
| <i>Aspergillus versicolor</i> (AY373880.1) | 0,0 | 99% |
| <i>Aspergillus versicolor</i> (KF381083.1) | 0,0 | 99% |
| <i>Aspergillus versicolor</i> (JN545818.1) | 0,0 | 99% |
| <i>Aspergillus versicolor</i> (JF817276.1) | 0,0 | 99% |
| <i>Aspergillus</i> sp. (KJ567464.1) | 0,0 | 99% |
| <i>Aspergillus</i> sp. (KC871019.1) | 0,0 | 99% |
| <i>Aspergillus</i> sp. (KF888648.1) | 0,0 | 99% |
| <i>Aspergillus carneus</i> (HQ889708.1) | 0,0 | 99% |
| <i>Aspergillus versicolor</i> (FJ878627.1) | 0,0 | 99% |
| <i>Aspergillus versicolor</i> (EF652442.1) | 0,0 | 99% |
| <i>Aspergillus versicolor</i> (AJ937752.1) | 0,0 | 99% |
| <i>Aspergillus versicolor</i> (JQ724473.1) | 0,0 | 99% |
| <i>Aspergillus versicolor</i> (FR733851.1) | 0,0 | 99% |

Para a sequência 31 foram recuperadas muitas espécies do gênero *Cladosporium* como mostra a Tabela 9 e principalmente da espécie *Cladosporium sphaerospermum*.

Tabela 9: Alinhamento local Blast utilizando a sequência do consenso 31 com as sequências depositadas no banco de dados NCBI.

| Espécie (Número de acesso) | <i>E-value</i> | Identidade |
|--|----------------|------------|
| <i>Cladosporium</i> sp. (KF293975.1) | 0,0 | 99% |
| <i>Cladosporium sphaerospermum</i> (AB572902.1) | 0,0 | 99% |
| <i>Cladosporium</i> sp. (KF293976.1) | 0,0 | 99% |
| <i>Cladosporium sphaerospermum</i> (JN084018.1) | 0,0 | 99% |
| Uncultured <i>Cladosporium</i> (KP099904.1) | 0,0 | 98% |
| Uncultured <i>Cladosporium</i> (KP099903.1) | 0,0 | 98% |
| Uncultured <i>Cladosporium</i> (KP099876.1) | 0,0 | 98% |
| <i>Cladosporium</i> sp. (KF367474.1) | 0,0 | 98% |
| <i>Cladosporium</i> sp. (KF293977.1) | 0,0 | 98% |
| <i>Cladosporium</i> sp. (KF293972.1) | 0,0 | 98% |
| <i>Cladosporium cladosporioides</i> (KJ767065.1) | 0,0 | 98% |
| <i>Cladosporium sphaerospermum</i> (AB572909.1) | 0,0 | 98% |
| <i>Cladosporium sphaerospermum</i> (AB572908.1) | 0,0 | 98% |
| <i>Cladosporium sphaerospermum</i> (AB572906.1) | 0,0 | 98% |
| <i>Cladosporium sphaerospermum</i> (AB572903.1) | 0,0 | 98% |
| <i>Cladosporium sphaerospermum</i> (AB572901.1) | 0,0 | 98% |
| <i>Cladosporium sphaerospermum</i> (AB572897.1) | 0,0 | 98% |
| <i>Cladosporium</i> sp. (JF694934.1) | 0,0 | 98% |
| <i>Cladosporium sphaerospermum</i> (GU017501.1) | 0,0 | 98% |
| Uncultured Ascomycota (HM162302.1) | 0,0 | 98% |

A região ITS ribossomal possui aproximadamente 580pb, então podemos perceber que o consenso obtido está de acordo com o produto esperado. A região 18S possui aproximadamente 1730pb. O tamanho do genoma de fungos varia até mesmo entre as espécies do mesmo filo. No filo Ascomycota a espécie *Aspergillus fumigatus* (Af293) tem genoma de aproximadamente 30Mb, com 8 cromossomos, o genoma de *Saccharomyces cerevisiae* (S288c) tem 12.1Mb e 16 cromossomos, *Magnaporthe grisea* tem 40Mb em 7 cromossomos. No filo dos Basidiomycetos a espécie *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* (CRL75-36-700-3) apresenta um genoma de 81.5 Mb e 18 cromossomos, *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (JEC21) tem um genoma de 19.1Mb e 14 cromossomos (Pevsner, 2009).

O isolado 7 apresentou maior proximidade no ramo de *Hypocrea jecorina*, com *bootstrap* de 2000 réplicas como mostra a Figura 11. Não podemos dizer que o isolado 7 pertence a esta espécie, pois existe uma diversidade muito grande de espécies dentro do gênero *Hypocrea*, e podemos ver pelo BLASTn e na árvore que houve uma identidade alta e *e-value* próximo de 0 para várias espécies diferentes do mesmo gênero devida a região 18S ribossomal ser bem conservada. Somente na Europa existem 75 espécies segundo

dados de 2011 do gênero *Hypocrea/Trichoderma*, esse gênero é tão complexo quanto o gênero *Fusarium* para a identificação filogenética devido à diversidade (Jaklitsch, 2009; 2011).

O isolado 18 apresentou maior proximidade no ramo em que se localiza *Penicillium* sp., com *bootstrap* de 2000 réplicas (Figura 12). A árvore apresenta diversas espécies do gênero *Penicillium*, que possuem identidade, *e-value* e cobertura similares, então podemos afirmar apenas o gênero para o isolado 18. Esta árvore foi feita com sequência da região 18S ribossomal, que é bem conservada. Podemos ver que esta árvore possui muitos isolados da espécie *Penicillium purpurogenum* e 1 *Talaromyces purpurogenus*, essas espécies secretam substâncias roxas assim como o isolado 18 (Figura 6).

O isolado 26 apresentou maior proximidade no ramo em que está localizada a espécie *Aspergillus versicolor*, foi obtido um *bootstrap* de 2000 réplicas. Podemos ver que tanto a árvore como o BLAST que existem apenas espécies do gênero *Aspergillus*, e que há uma frequência alta de *Aspergillus versicolor* como podemos ver na Figura 13. Essa árvore foi feita com sequências da região ITS ribossomal.

O isolado 31 apresentou maior proximidade no ramo em que o gênero *Cladosporium* sp. está localizado, foi obtido um *bootstrap* de 2000 réplicas (Figura 14). Esta árvore apresentou uma frequência alta de diversas cepas da espécie *Cladosporium sphaerospermum* que foram recuperadas no BLASTn com valores de identidade alta acima de 85%, *e-value* próximo de 0 e cobertura da sequência alta. Essa árvore foi feita com sequências da região ITS ribossomal. Muitas espécies e cepas do gênero *Cladosporium* estão relacionadas à tolerância a metais ou a outras condições estressantes como alta concentração de sais (Shao e Sun, 2007; Zalar *et al.*, 2007).

Foram feitas árvores para os isolados 18, 26 e 31 utilizando sequências de material “Type” do BLASTn, as árvores encontram-se em anexo. Em 2013 o banco de dados de Taxonomia do NCBI começou a incluir o filtro de material tipo para eucariotos e procariotos. No banco de dados pode conter várias sequências de cepas da mesma espécie, as sequências de material tipo foram revisadas pelo NCBI (Coordinators, 2013). A sequência do isolado 7 não alinhou com as sequências “tipo” do BLASTn, por isso não foi possível delinear árvore para esse isolado .

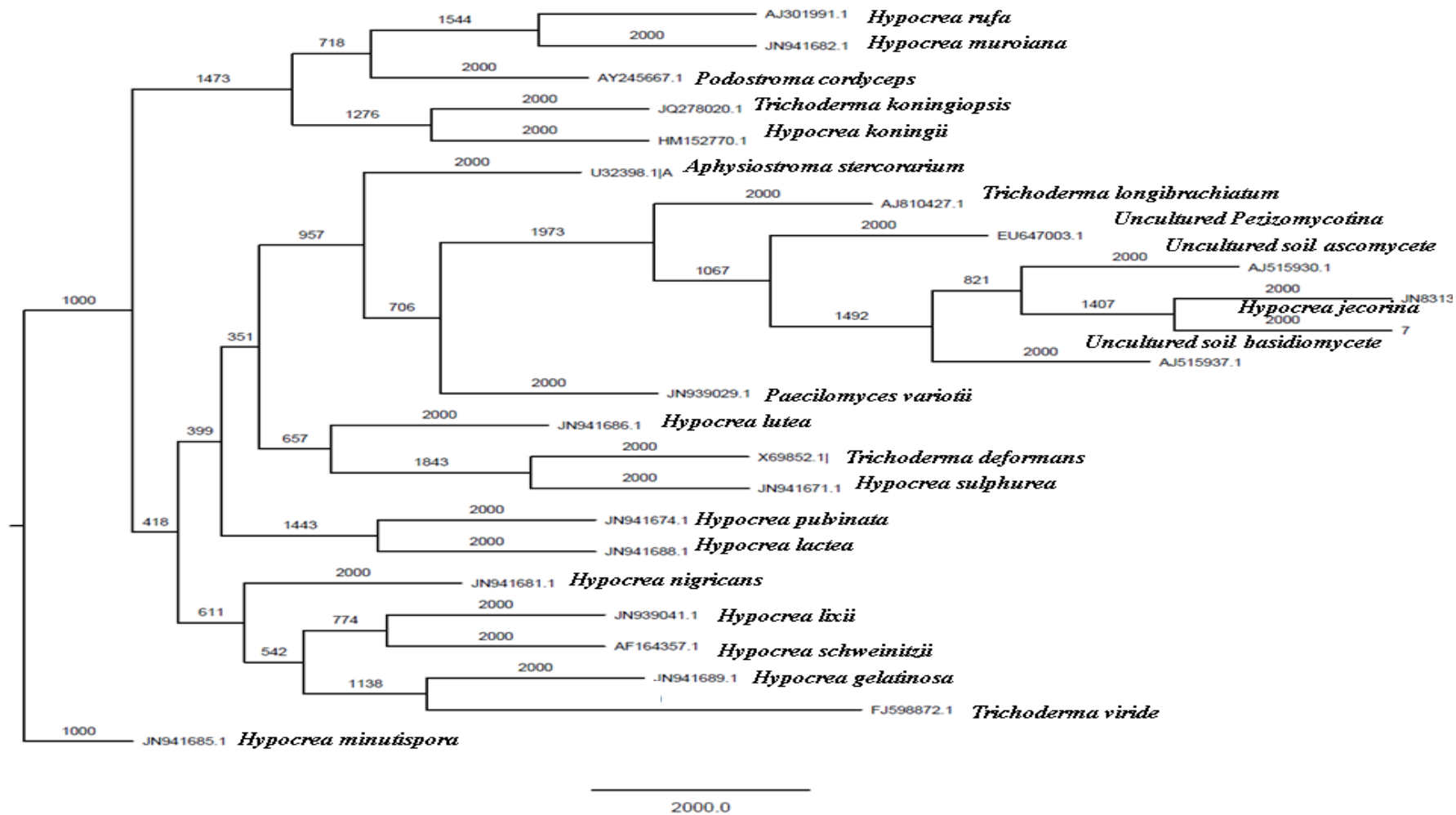


Figura 11:Árvore filogenética baseada do isolado 7 na sequência da região 18S ribossomal: A árvore filogenética foi construída utilizando o algoritmo Kimura, *Neighbor-Joining* por meio do programa FigTree 1.4.2, mostrando que o isolado pertence ao gênero *Hypocrea* sp.

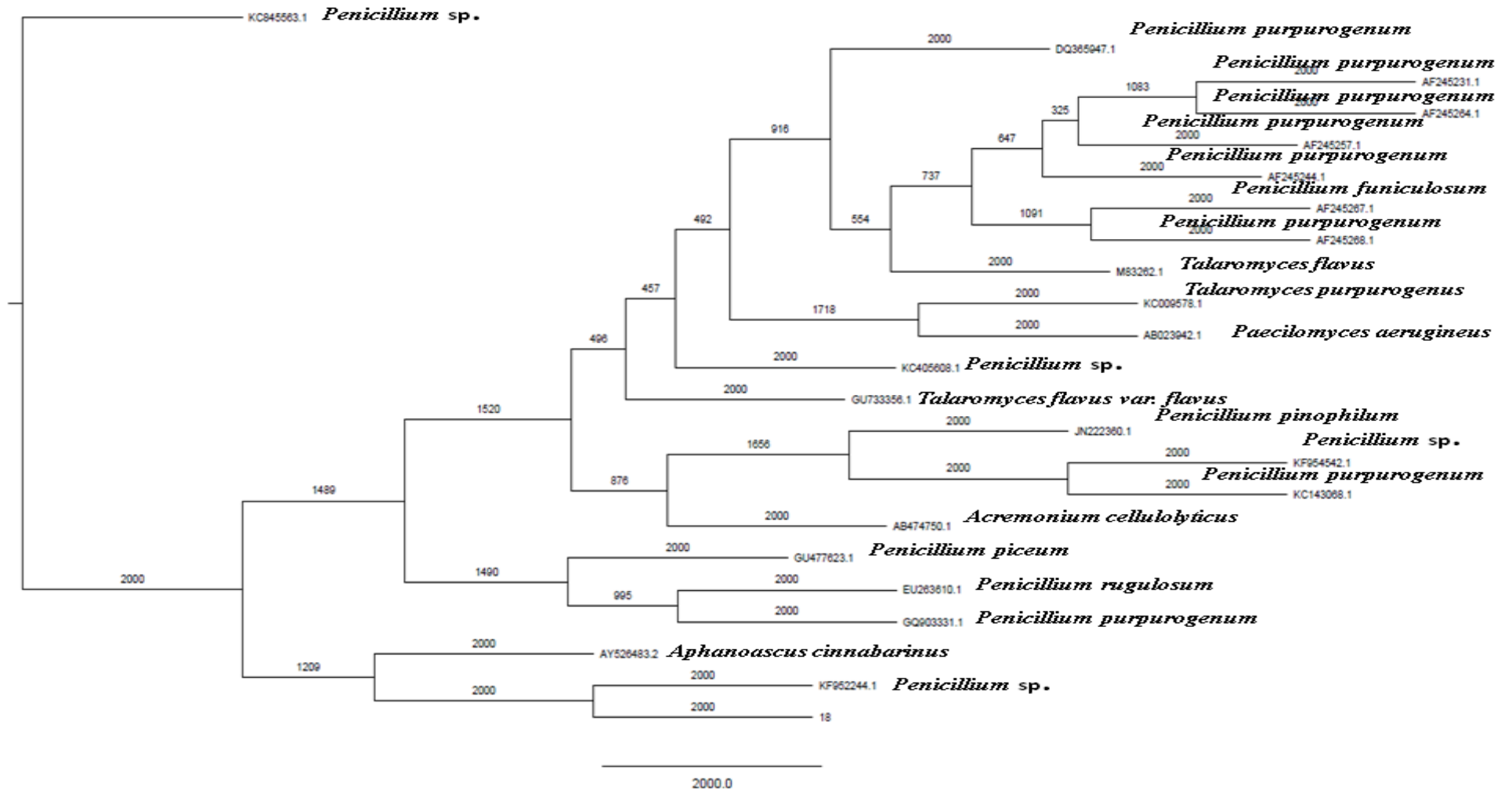


Figura 12:Árvore filogenética baseada do isolado 18 na sequência da região 18S ribossomal: A árvore filogenética foi construída utilizando o algoritmo Kimura, *Neighbor-Joining* por meio do programa FigTree 1.4.2, mostrando que o isolado pertence ao gênero *Penicillium* sp.

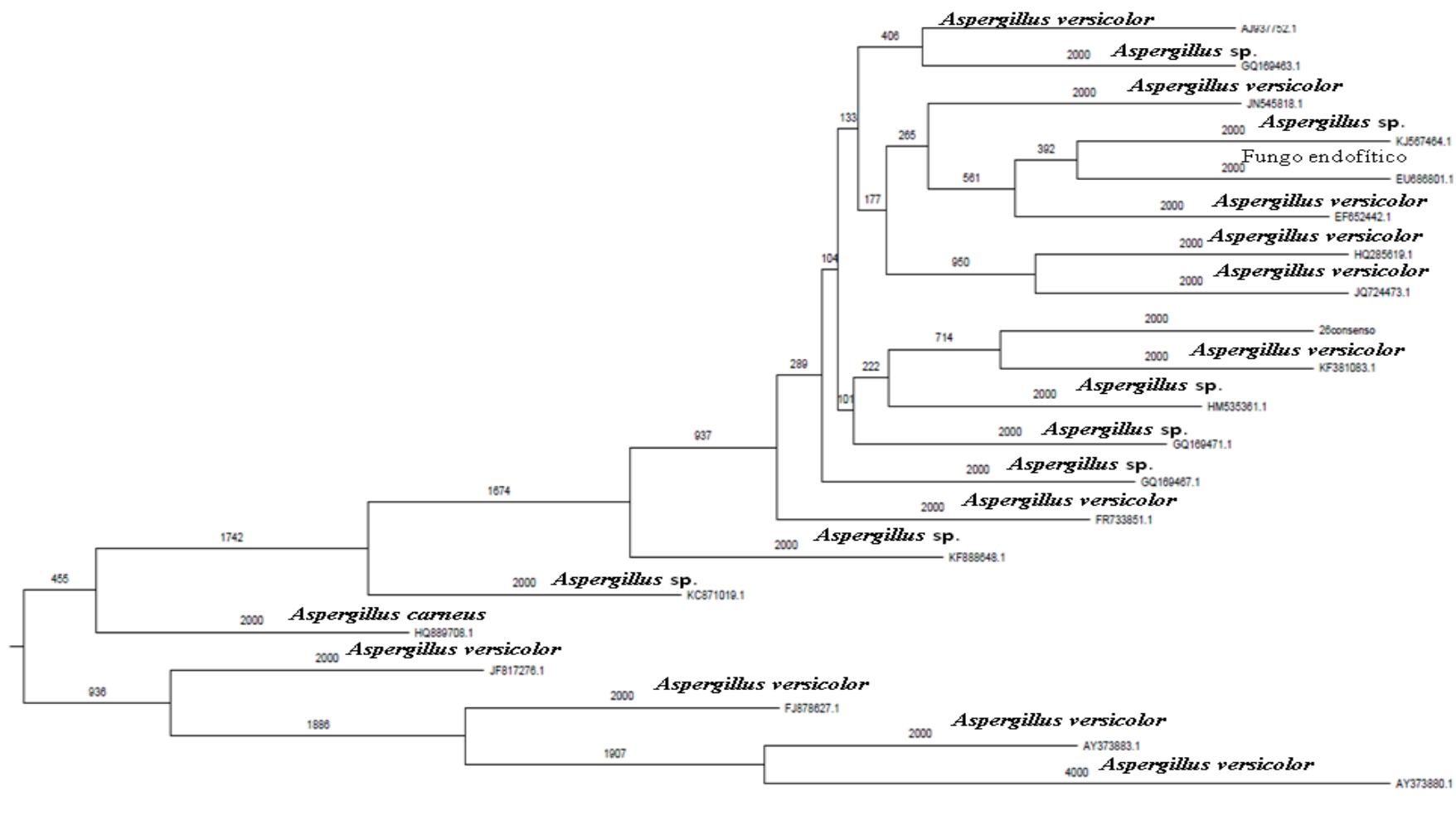


Figura 13:Árvore filogenética baseada do isolado 26 na sequência da região ITS ribossomal: A árvore filogenética foi construída utilizando o algoritmo Kimura, *Neighbor-Joining* por meio do programa FigTree 1.4.2, mostrando que o isolado pertence ao gênero *Aspergillus* sp.

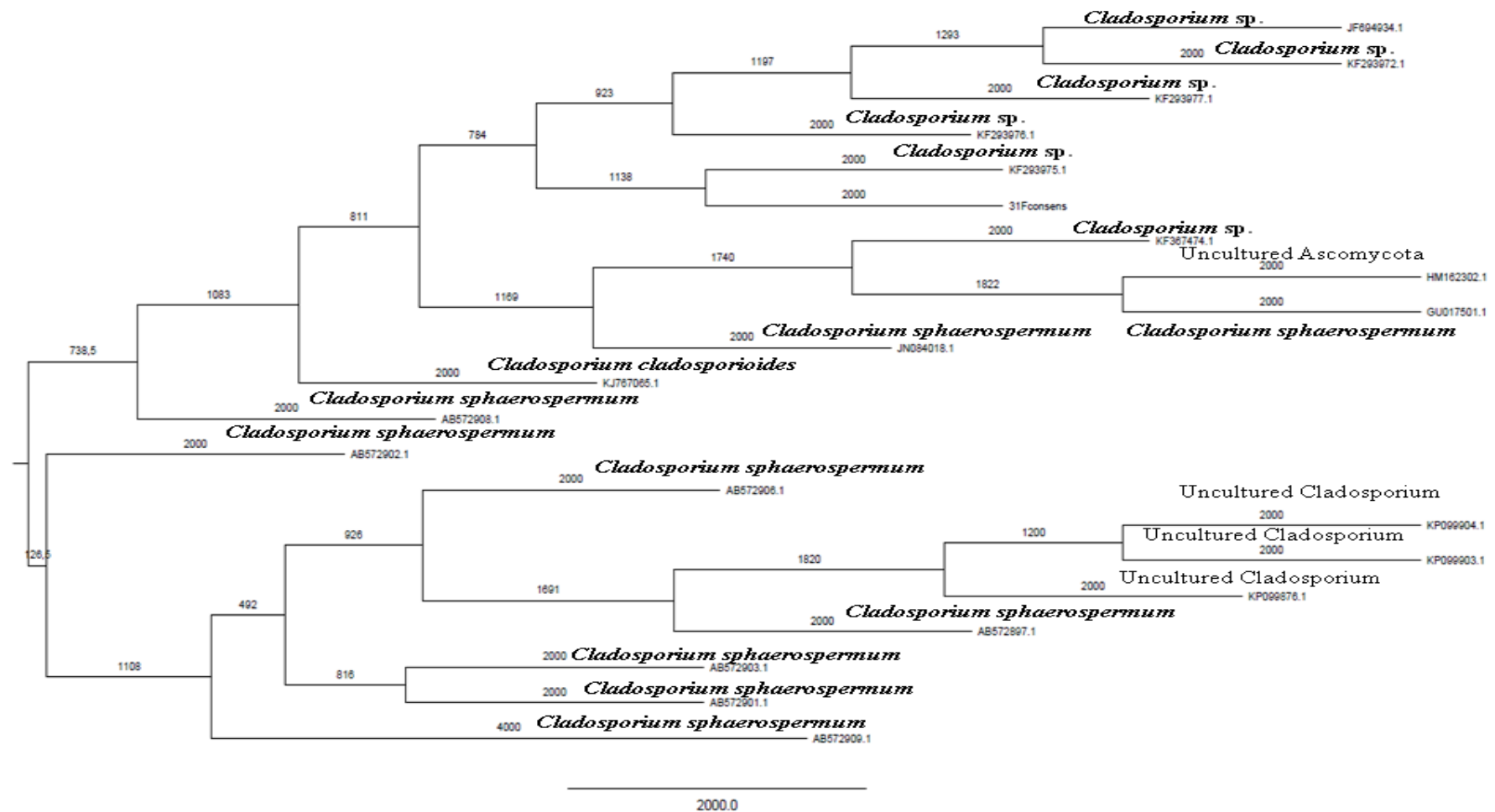


Figura 14:Árvore filogenética baseada do isolado 31 na sequência da região ITS ribossomal: A árvore filogenética foi construída utilizando o algoritmo Kimura, *Neighbor-Joining* por meio do programa FigTree 1.4.2, mostrando que o isolado pertence ao gênero *Cladosporium* sp.

4.6-Ensaio para avaliação do potencial de remoção de Mn^{2+} solúvel em meio de cultura

4.6.1- Ensaio com 140 mgL^{-1} de Mn^{2+}

O teste de remoção de 140 mgL^{-1} de Mn^{2+} solúvel em 150 mL de caldo *Sabouraud* feito em 35 dias, mostra a dinâmica da concentração dos íons de manganês em relação às mudanças de pH do meio. Os resultados foram divididos em dois gráficos para melhor visualização. O pH sofre muita variação ao decorrer do experimento, sofre queda nos primeiros 15 dias em quase todos os isolados, isso pode ser devido a produção de ácidos orgânicos pelos fungos durante a fase de crescimento das hifas (Gadd, 2007) e também devido a grande quantidade de glicose presente nesse meio.

O isolado 7 (*Hypocrea* sp.) removeu 54% (Figura 15). Enquanto o pH do meio de cultura era 5, esse isolado não demonstrou remoção de manganês solúvel. Quando o pH do meio subiu de 5 para 6 e 7 foi possível detectar remoção de Mn^{2+} , pHs acima de 7 provocam remoção puramente química, então podemos perceber que esse fungo deve possuir algum mecanismo de remoção de Mn^{2+} . Quando o pH estava ácido não houve remoção detectável, mas não podemos dizer que a remoção foi química, pois o pH se manteve de ácido a neutro (Figura 16 e 17).

Hypocrea jecorina foi a espécie que mais apresentou proximidade com o isolado 7 pela análise filogenética, para esta espécie não foi descrito capacidade de remoção de manganês. Segundo Salvadori *et al.* (2013) a biomassa de *Hypocrea lixii* tem capacidade de adsorver cobre. A adesão do cobre com o fungo é através da interação com grupos amida, eles observaram também que havia proteínas ao redor das partículas de cobre.

O isolado 18 (*Penicillium* sp.) removeu 79,99% (Figura 15) com pHs variando de 5 a 7, a maior queda ocorreu de 15 a 25 dias de cultivo, o pH parece não ter influenciado na remoção de Mn^{2+} desempenhada por esse isolado, visto que a concentração do íon está sempre em queda durante todo o período do ensaio (Figura 16 e 17).

Penicillium purpurogenum foi a espécie com mais incidência no BLASTn para o isolado 18. Esta espécie ainda não foi testada em relação à capacidade de remover manganês, mas possui capacidade de adsorção de cromo, chumbo, arsênio, mercúrio e cádmio (Say *et al.*, 2003; Say *et al.*, 2004).

O isolado 23 removeu 43,73%, foi o isolado que menos removeu (Figura 15), isso se deve a grande queda de pH, em duas semanas o pH foi para 3.0. Sabemos que a oxidação de íons de manganês é quimicamente favorável em pH básico, essa queda brusca favorece a redução, então mesmo se esse fungo possuir algum mecanismo de oxidação de manganês, o ambiente fortemente redutor ocasionaria a não permanência dos óxidos de manganês formados (Figura 16 e 17).

O isolado 26 (*Aspergillus* sp.) apresentou uma taxa de remoção de 90,88% (Figura 15). Essa taxa é bastante elevada, mas se observarmos a dinâmica do pH, veremos que parte do ensaio o pH está entre 7 e 8, de neutro a básico, com esse pH já é possível ocorrer alguma remoção química do metal (Figura 16 e 17). Este isolado possivelmente apresenta algum mecanismo de remoção, pois já nos primeiros 15 dias de cultivo quando o pH era 5.5-6.0 havia uma queda de concentração de Mn^{2+} solúvel, porém posteriormente houve alcalinização do meio indicando uma remoção química. Então deve haver uma sinergia entre a remoção química e a remoção biológica.

Aspergillus versicolor foi a espécie que mais apresentou proximidade com o isolado 26 e ainda não foi descrito como fungo capaz de remover manganês, mas já foi descrito como fungo capaz de adsorver mercúrio, cromo, cobre e níquel (Das *et al.*, 2009; Taştan *et al.*, 2010). Segundo Tsekova *et al.* (2010) *Aspergillus niger* tem capacidade de bioadsorção de vários metais incluindo manganês.

O isolado 31 (*Cladosporium* sp.) apresentou uma alta taxa de remoção, 86,07% (Figura 15). O pH mínimo desse isolado foi 5, indicando que o isolado deve possuir algum mecanismo eficiente de remoção de íons de manganês, pois mesmo em ambiente redutor ele apresentou uma taxa satisfatória (Figura 16 e 17). O ensaio indica que esse seja o isolado mais promissor para ser usado na biorremediação, visto que ele apresentou remoção em pH ácido e durante o período de ensaio o pH não apresentou valores maiores que 7.0.

Cladosporium cladosporioides é descrito por Shao e Sun (2007) como um fungo capaz de internalizar manganês e precipita-lo dentro da hifa, esse processo é facilitado pela presença de magnésio e fósforo no meio. O fungo *Cladosporium sphaerospermum* foi a espécie que mais apresentou proximidade com o isolado 31, porém não está relacionado ainda na literatura com mecanismos de oxidação ou outras formas de biorremoção de manganês.

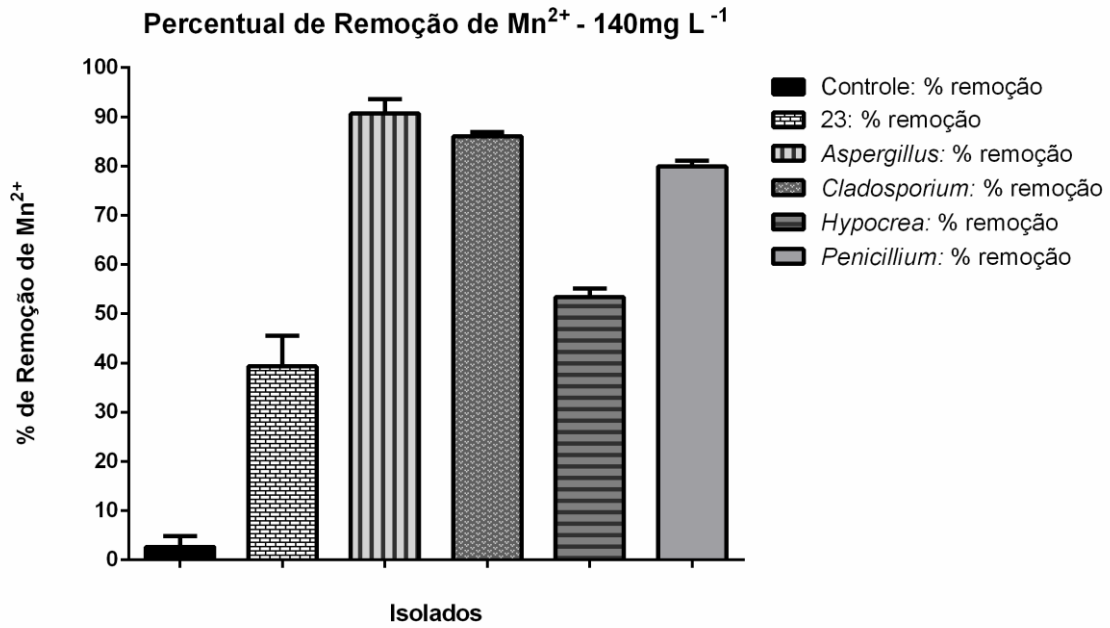


Figura 15: Remoção de Mn^{2+} por fungos filamentosos: A figura mostra a porcentagem de remoção de Mn^{2+} ao fim dos 35 dias de experimento. Os experimentos foram feitos em triplicata.

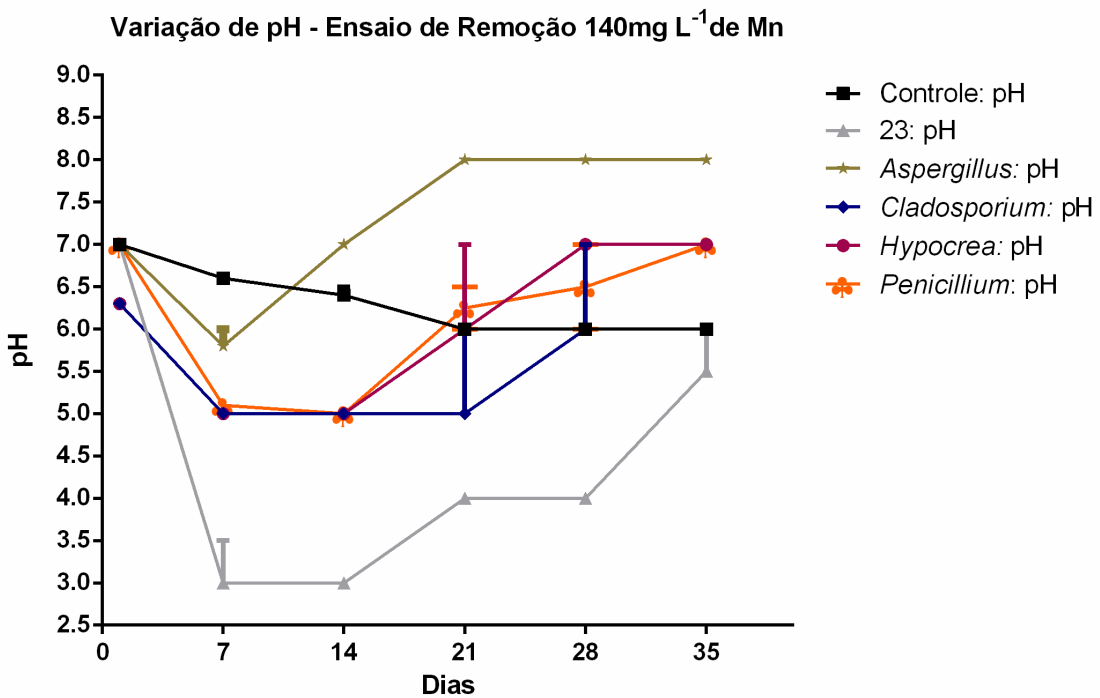


Figura 16: Variação de pH do experimento de remoção de Mn^{2+} por fungos filamentosos: A figura mostra a dinâmica do pH durante os 35 dias de experimento. Os experimentos foram feitos em triplicata.

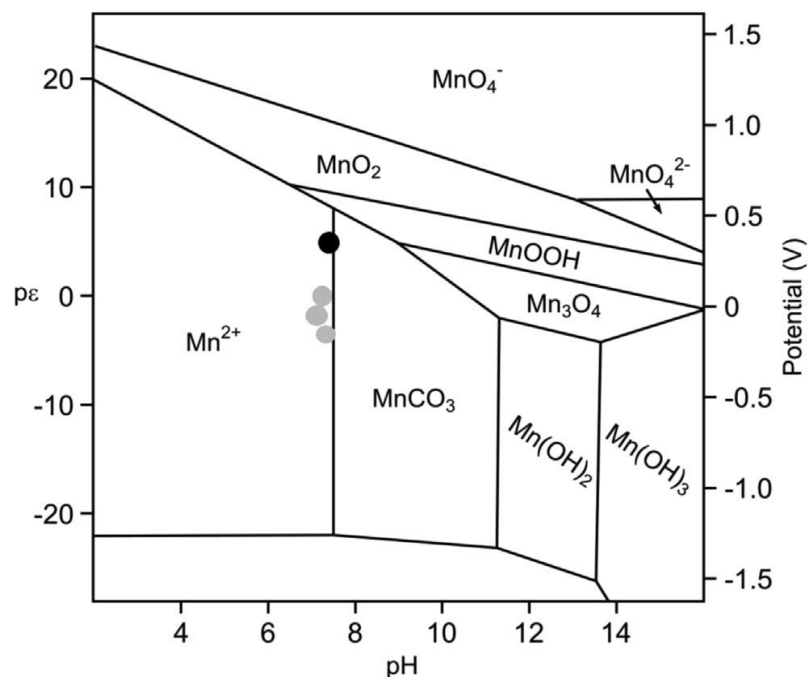


Figura 17: Diagrama de potencial redox e pH em relação aos estágios de oxidação do Mn (Bruins *et al.*, 2015).

4.6.2- Ensaio com 50 mgL⁻¹ de Mn²⁺

Foi realizado um ensaio com 50 mgL⁻¹ de Mn²⁺ para verificar se os isolados apresentam melhores taxas de remoção em menores concentrações do metal solúvel no meio. Os resultados foram divididos em dois gráficos para melhor visualização.

O isolado 7 (*Hypocrea* sp.), removeu 69,75% no ensaio com 50 mgL⁻¹ de Mn²⁺, o isolado 23 removeu 86,48%, o isolado 26 *Aspergillus* sp. removeu 49% e o isolado 31 *Cladosporium* sp. removeu 96,54% (Figura 18). As triplicatas correspondentes ao isolado 18, *Penicillium* sp. não permaneceram em condições estéreis, portanto não há resultados com 50 mgL⁻¹ de Mn²⁺ para esse isolado. A dinâmica do pH foi similar a do ensaio com 140 mgL⁻¹ de Mn²⁺ (Figura 19).

Podemos perceber que os fungos em geral apresentaram taxas de remoção maiores com 50 mgL⁻¹ de Mn²⁺ do que no ensaio com 140 mgL⁻¹ de Mn²⁺, isso já era esperado, pois cerca de um terço da concentração de Mn²⁺ foi utilizada em um mesmo intervalo de tempo. Somente o isolado *Aspergillus* sp. apresentou taxas significativamente menores no ensaio com 50 mgL⁻¹ de Mn²⁺, isso pode ser devido a demora no desenvolvimento das hifas (dados não mostrados). O inoculo usado correspondente ao isolado 26 demorou a

crescer neste ensaio, isso acarretou em uma diminuição da taxa de remoção de manganês desempenhada por esse fungo.

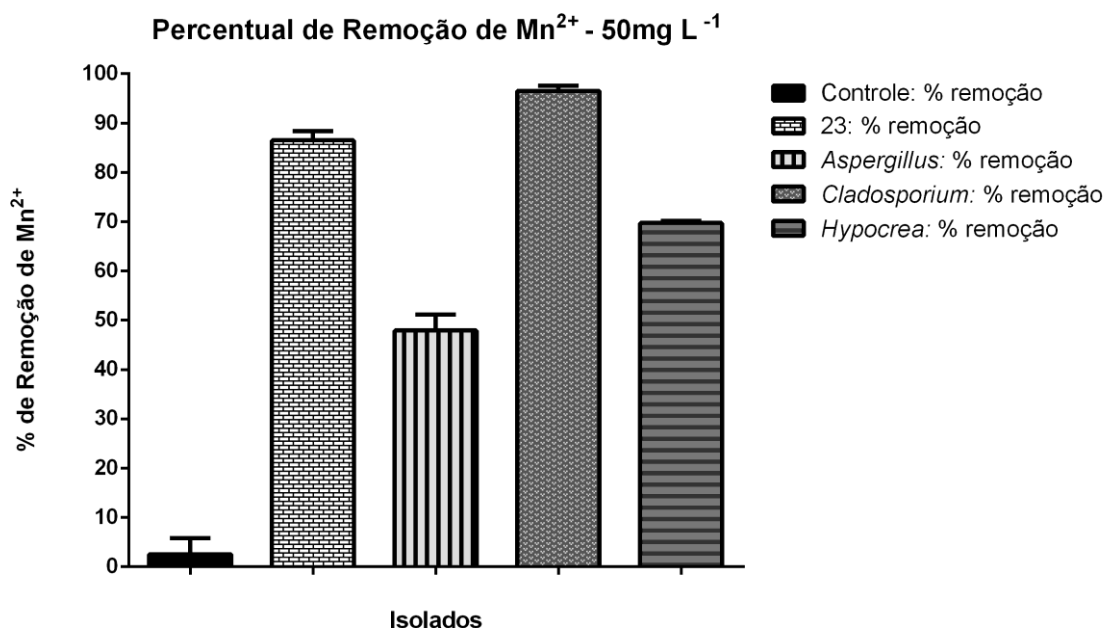


Figura 18: Remoção de Mn²⁺ por fungos filamentosos: A figura mostra a porcentagem de remoção de Mn²⁺ ao fim dos 35 dias de experimento. Os experimentos foram feitos em triplicata.

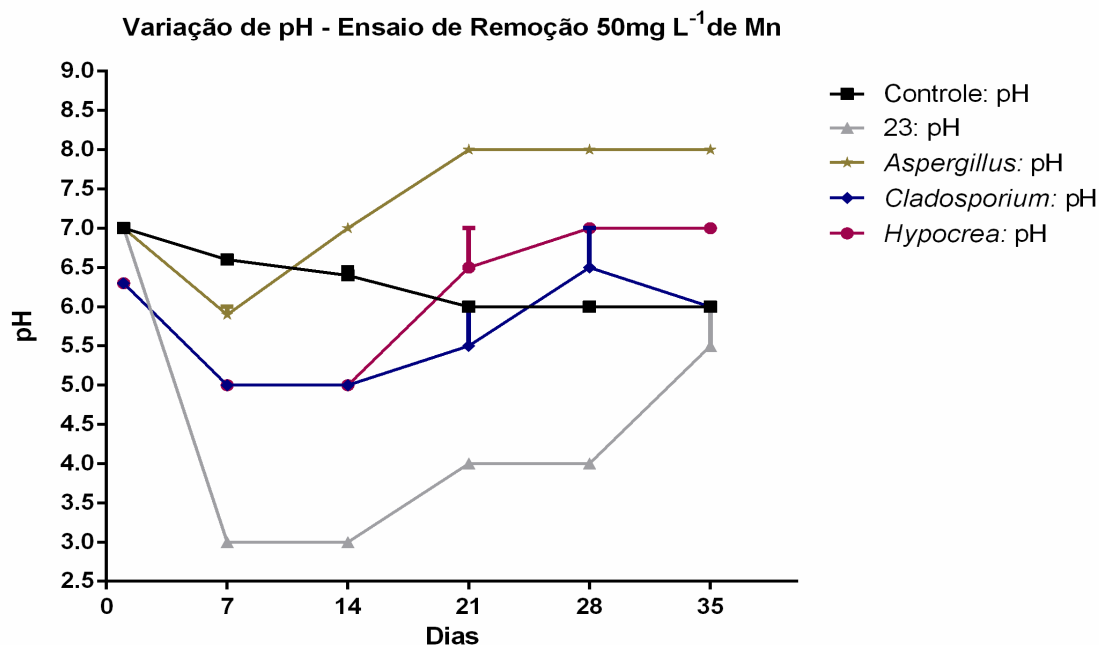


Figura 19: Variação de pH do experimento de remoção de Mn²⁺ por fungos filamentosos: A figura mostra a dinâmica do pH durante os 35 dias de experimento. Os experimentos foram feitos em triplicata.

4.7-Ensaio para avaliação do potencial de redução de MnO₂ insolúvel em meio de cultura

Este trabalho visa selecionar espécies de fungos filamentosos competentes na biorremocção de manganês para a descontaminação de águas, então é importante avaliar se os isolados testados na biorremocção de manganês também são capazes de reduzir óxidos de manganês, pois vários fungos participam do ciclo biogeoquímico do manganês oxidando e reduzindo dependendo das condições ambientais (Burford *et al.*, 2003). Se os isolados forem capazes de reduzir, eles não são economicamente eficientes e, portanto, não são desejáveis para a aplicação de biorremediação de águas contaminadas pela mineração.

O ensaio de redução foi realizado nas mesmas condições do ensaio de remoção, porém foi usado bióxido de manganês no lugar de sulfato de manganês. Assim como o ensaio de remoção, o ensaio de redução considerou a dinâmica do pH durante os 35 dias de experimento. Os resultados também foram divididos em duas figuras para melhor visualização. Foi considerada normal uma redução pequena inicial devido a grande quantidade de glicose presente no meio, que quando metabolizada pelos fungos, ocorre a produção de ácidos que diminuem o pH do meio, fazendo com que a redução química seja favorável (Acharya *et al.*, 2003; Wei *et al.*, 2012).

Houve redução crescente de MnO₂ do primeiro até o vigésimo dia de cultivo no meio em que o isolado 7 (*Hypocrea* sp.) foi inoculado (Figura 20), a dinâmica do pH foi praticamente a mesma evidenciada no ensaio de remoção (Figura 21). Após o vigésimo dia, a concentração de Mn²⁺ no meio começou a cair, talvez pela composição do meio, esse caldo *Sabouraud* é um meio com muita glicose e não tem tampão para manter o pH. Novos experimentos usando meios pobres são necessários para tentar solucionar esse problema de acidificação do meio nos experimentos de remoção e de redução.

Houve redução crescente de MnO₂ no meio em que o isolado 18 (*Penicillium* sp) foi inoculado (Figura 20), a dinâmica do pH foi diferente da observada no ensaio de remoção (Figura 21). No ensaio de remoção o pH foi maior que 5.0 após o vigésimo dia de cultivo aumentando até a neutralidade, no ensaio de redução o maior pH observado está próximo de 5.0. Este isolado produz uma quantidade muito grande de compostos que são secretados para o meio, esse fato é percebido pela coloração do meio. Sem o isolado o meio tem uma coloração amarelo âmbar e após alguns dias de cultivo, se torna de vermelho a roxo (ver Figura 6 do isolamento em placa).

O isolado 23 reduziu de forma crescente até pouco menos de vinte dias de cultivo, posteriormente houve uma remoção do que foi reduzido (Figura 20). Houve um aumento de pH que pode ter auxiliado a remoção, mas quando o pH ainda estava na faixa de 5-6 (de vinte a trinta dias de cultivo), o isolado já apresentava remoção acentuada do Mn^{2+} solúvel (Figura 21). Podemos ver que a taxa final de redução está próxima da taxa de remoção do grupo controle, que é uma redução que ocorre no momento em que MnO_2 é adicionado ao meio.

O isolado 26 (*Aspergillus* sp.) apresentou redução constante em pHs de 5-6 durante todo o ensaio (Figura 20). A dinâmica do pH desse isolado divergiu muito da apresentada no experimento de remoção, porém não foram observadas contaminações na cultura (Figura 21). Este isolado foi o que mais reduziu neste ensaio e o que mais removeu no ensaio de biorremoção com 140 mgL^{-1} de Mn^{2+} . Se este isolado apresentar a mesma dinâmica de remoção/redução em meios pobres, ele não é indicado para biorremediação.

O isolado 31 não apresentou redução. *Cladosporium* sp. apresentou uma remoção do Mn^{2+} que é solubilizado quando o bióxido de manganês é adicionado ao meio (esta quantidade está presente em todos os isolados inclusive no controle), isso é evidenciado pela taxa de redução desse isolado ser menor do que a taxa do grupo controle (Figura 20). O pH do isolado 31 manteve a dinâmica observada no experimento de remoção (Figura 21).

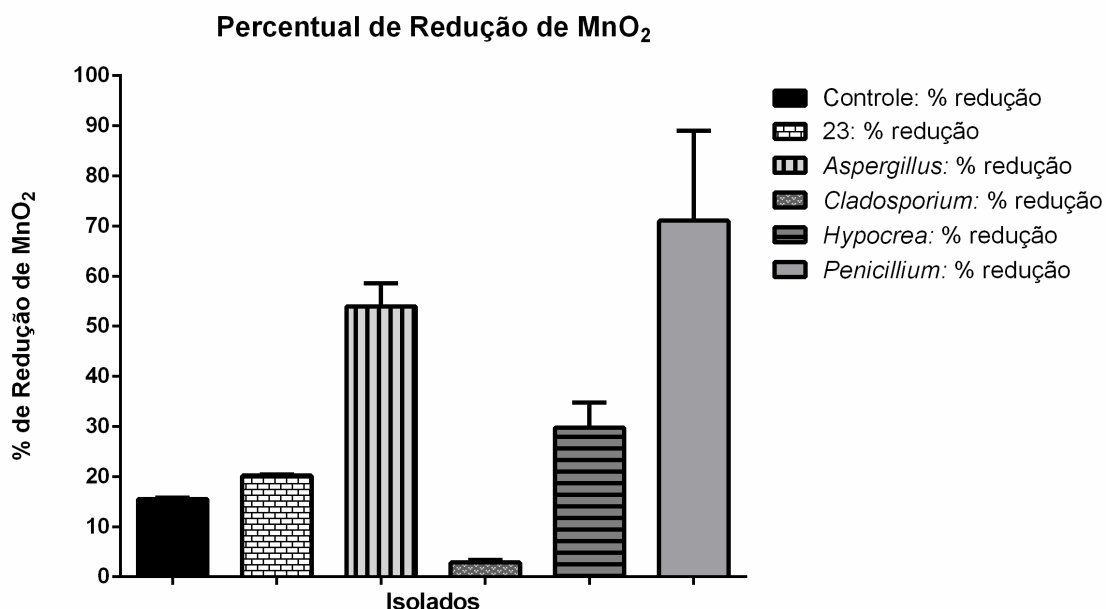


Figura 20: Redução de MnO_2 por fungos filamentosos: A figura mostra a porcentagem de redução de MnO_2 ao fim dos 35 dias de experimento. Os experimentos foram feitos em triplicata.

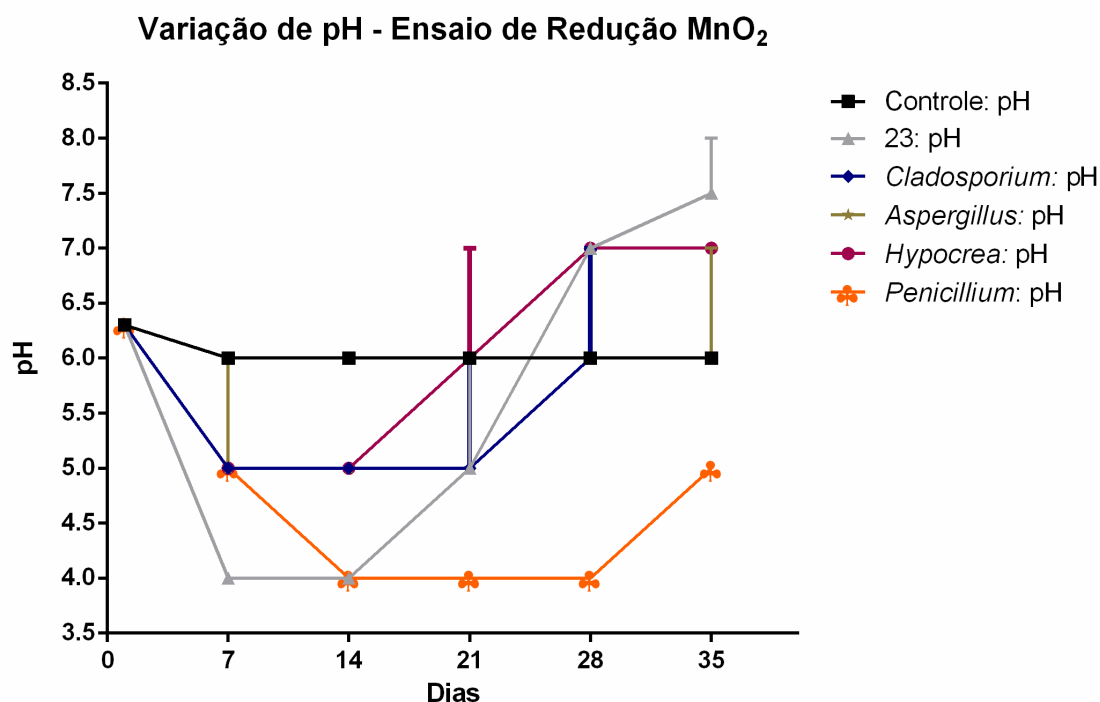


Figura 21: Variação de pH do experimento de redução de MnO₂ por fungos filamentosos: A figura mostra a dinâmica do pH durante os 35 dias de experimento. Os experimentos foram feitos em triplicata.

4.8-Ensaio da Atividade da Lacase em placa

Esse ensaio foi feito devido alguns autores atribuírem a oxidação de manganês à ação da enzima lacase ou a sinergia entre a lacase e a manganês peroxidase (Gorbacheva *et al.*, 2009). A atividade da lacase é evidenciada pela coloração azul-esverdeado do meio, pela redução do cobre do sítio T1(Kunamneni *et al.*, 2008). Como descrito em Materiais e Métodos item 3.8, foi feito um ensaio qualitativo para avaliar se a enzima lacase extracelular é produzida pelos isolados. Este ensaio foi feito em meio suplementado com 140 mgL⁻¹ de Mn²⁺ para detectar se a expressão da lacase está associada a presença de Mn em relação aos que cresceram somente no meio com o substrato.

Vários estudos avaliam a presença de lacases como More *et al.* (2011). Eles adicionaram fluido extracelular do fungo *Pleurotus* sp. em um gel de agarose 0.5% contendo 0.5mM de ABTS. Neste trabalho, o ensaio não foi feito como More *et al.* (2011). O experimento deste trabalho foi feito como Hartikainen *et al.* (2013): o ABTS foi

adicionado ao meio Agar *Sabouraud* e cada fungo foi inoculado na presença e na ausência de 140 mgL^{-1} de Mn^{2+} . Esse protocolo foi utilizado com o objetivo de visualizar o aumento dos halos colorimétricos de atividade com o decorrer dos dias. Assim é possível saber com quantos dias aproximadamente o isolado começa a secretar a enzima.

Podemos observar pela Figura 22 que não houve atividade nas placas controle com 140 mgL^{-1} de Mn^{2+} nem na placa com Mn ausente. O fungo 7 (*Hypocrea* sp.) não apresentou atividade na cultura crescida em Agar *Sabouraud*, ABTS e ampicilina $100\mu\text{g/mL}$, nem na cultura crescida em Agar *Sabouraud*, ABTS, ampicilina $100\mu\text{g/mL}$ e 140mgL^{-1} de Mn^{2+} . Então, para esse isolado não podemos sugerir diferenças de expressão de genes de enzimas multicobre oxidase induzida ou reprimida pela presença de metais, no caso, o Mn^{2+} . A placa de cultura ficou incubada até trinta dias e não foi visualizada nenhuma mudança de cor (Figura 23).

Tamayo Ramos *et al.* (2011) realizou ensaios testando a atividade de diversos tipos de multicobre oxidase (Mcos) em diferentes substratos, esses ensaios foram feitos em placa e todos com evidência colorimétrica no caso de ocorrer reação da enzima Mco com o substrato. O teste de atividade enzimática foi feito com 10 tipos de Mcos e 4 tipos de substrato diferentes, cada placa apresentava um único substrato e um único tipo de Mco. Eles perceberam que 5 Mcos oxidam o substrato ADBP/DMA (McoA, McoB, McoC, McoD e McoG), 5 oxidam o substrato ABTS (McoB, McoC, McoD, McoG e McoJ), 5 oxidam o substrato DMPPDA (McoA, McoB, McoC, McoD e McoG) e 6 oxidam o substrato DMP (McoB, McoE, McoF, McoG, McoI e McoM). Então, para descartarmos a possibilidade de oxidação de Mn^{2+} realizada por multicobre oxidase, deve ser feito outro experimento usando os outros substratos, pois pode ser que a enzima que o isolado *Hypocrea* sp. possui esteja relacionada com a remoção do manganês, mas que não tenha a capacidade de oxidar o substrato utilizado, no caso, o ABTS.

O fungo *Trichoderma reesei* (estado anamorfo de *Hypocrea jecorina*, a espécie com maior proximidade com o isolado 7 na árvore filogenética) foi utilizado por Mander *et al.* (2006) para superexpressar genes da enzima lacase, e o sucesso dos mutantes criados foi evidenciado pelo teste com ABTS e ADBP/DMA, os próprios genes da lacase foram usados como genes repórteres devido ao ensaio colorimétrico. Nesse ensaio os autores também perceberam assim como Tamayo Ramos *et al.* (2011), diferenças dos vários tipos de multicobre oxidase, no caso lacases, reagindo com os diferentes substratos.

O fungo 18 (*Penicillium* sp.) apresentou uma pequena atividade da lacase com três dias de cultivo. Por volta de 16 dias de cultura a placa ficou completamente com a

coloração preto-azulada, tanto na placa do isolado que cresceu na presença de Mn^{2+} como na placa do isolado que cresceu sem Mn^{2+} (Figura 24). Os resultados sugerem que a presença e proporção da enzima lacase secretada é independente da presença de Mn. Esse isolado apresentou uma biorremocção de Mn^{2+} de 79,99% que pode estar relacionada a presença de lacases extracelulares. Dhakar *et al.* (2014) detectou produção de lacases por *Penicillium pinophilum*, que é inclusive uma das espécies presentes na árvore do isolado 18.

O isolado 23 apresentou atividade da lacase por volta de três dias de cultura em Agar *Sabouraud*. Podemos ver que houve maior secreção de lacases no isolado que cresceu na presença de 140 mgL^{-1} de Mn^{2+} (Figura 25). Nos três primeiros dias de cultivo o isolado em que foi suplementado Mn^{2+} teve maior detecção de atividade da lacase, mas o isolado que cresceu na ausência de Mn^{2+} alcançou a mesma proporção de atividade com o decorrer dos dias, porém tardiamente em relação ao isolado com Mn^{2+} . A presença de Mn e de outros metais pode estimular a expressão de genes da lacase (Janusz *et al.*, 2013). A enzima lacase também pode estar relacionada com a remoção de Mn^{2+} desempenhada pelo fungo 23, pois ele possui lacases e apresentou 43,73% de remoção do Mn^{2+} inicial.

O isolado 26 (*Aspergillus* sp.) não foi positivo para o teste de presença de lacases (Figura 26). Não podemos atribuir nenhum aumento ou diminuição de produção de lacases induzida ou reprimida pela presença de Mn^{2+} , afinal não houve evidência colorimétrica do meio do isolado 26 crescido na ausência de Mn^{2+} , tampouco na presença de Mn^{2+} . O ABTS pode não ser o substrato adequado para o tipo de multicobre oxidase produzida por esse isolado (Tamayo Ramos *et al.*, 2011). Foi descrito por Scherer e Fischer (1998) que fungos *Aspergillus nidulans* possuem dois tipos de lacases: uma presente na fase de reprodução assexuada e outra presente na fase de reprodução sexuada.

O isolado 31 (*Cladosporium* sp.) apresentou atividade da lacase já com 1,5 dias, quando havia um pequeno crescimento de hifas ao redor do inóculo (Figura 27). A remoção de Mn^{2+} observada no ensaio de batelada com Mn^{2+} também ocorreu desde a primeira semana para este isolado. No ensaio de redução de bióxido de manganês esse isolado não reduziu em nenhum momento, nem nos primeiros dias de cultivo em que a acidez do meio é maior, pelo contrário, ele removeu a pequena taxa de manganês solúvel. A remoção de Mn^{2+} observada por esse isolado tanto no experimento de remoção como no experimento de redução pode estar relacionada à alta produção e secreção de lacases desde o início do crescimento das hifas deste fungo. Não houve diferença de atividade de lacases

no isolado que cresceu em meio suplementado com Mn^{2+} e no isolado que cresceu na ausência de 140 mgL^{-1} de Mn^{2+} .

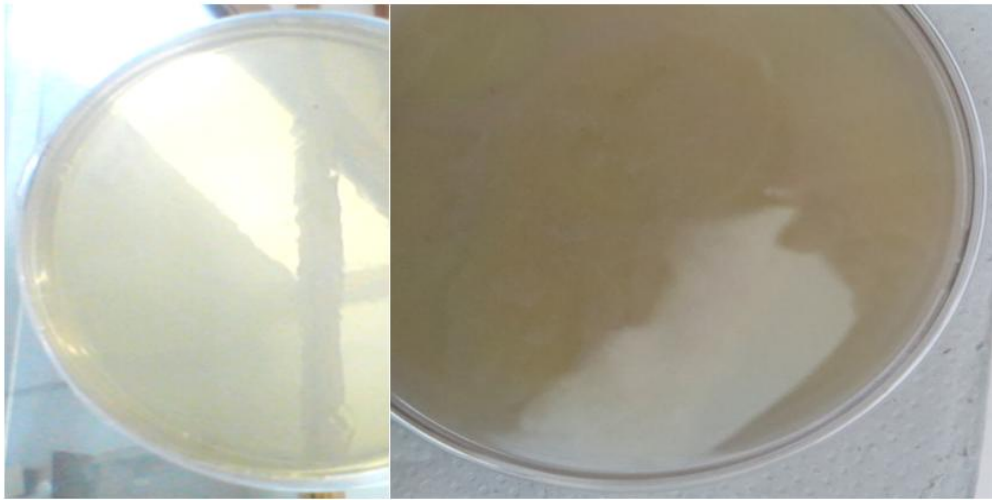


Figura 22: Atividade qualitativa da lacase em placa: a esquerda a placa controle com ABTS e manganês e a direita a placa com ABTS e sem manganês.

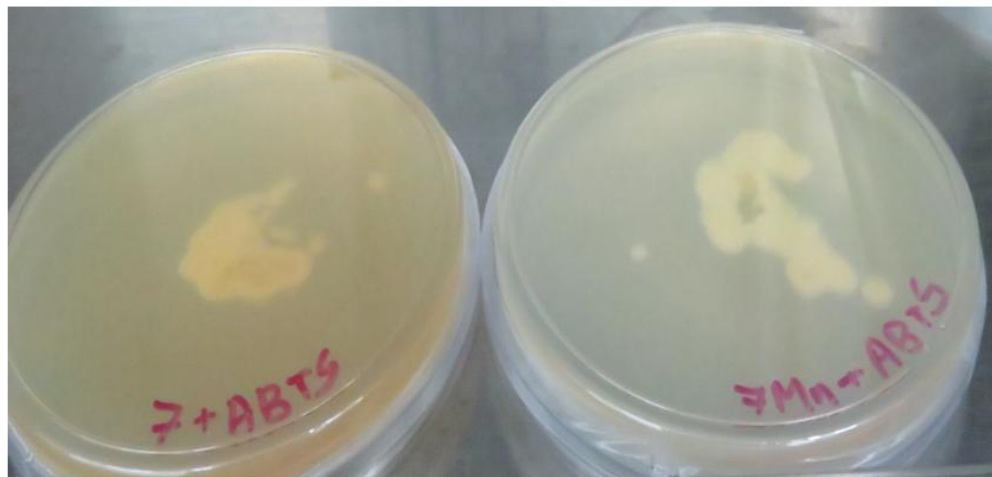


Figura 23: Atividade qualitativa da lacase em placa: a esquerda o isolado 7, identificado como *Hypocrea* sp. crescendo na placa com ABTS e a direita o mesmo isolado suplementado com manganês na placa com ABTS. A figura mostra a não presença da enzima extracelular devido à ausência de atividade.

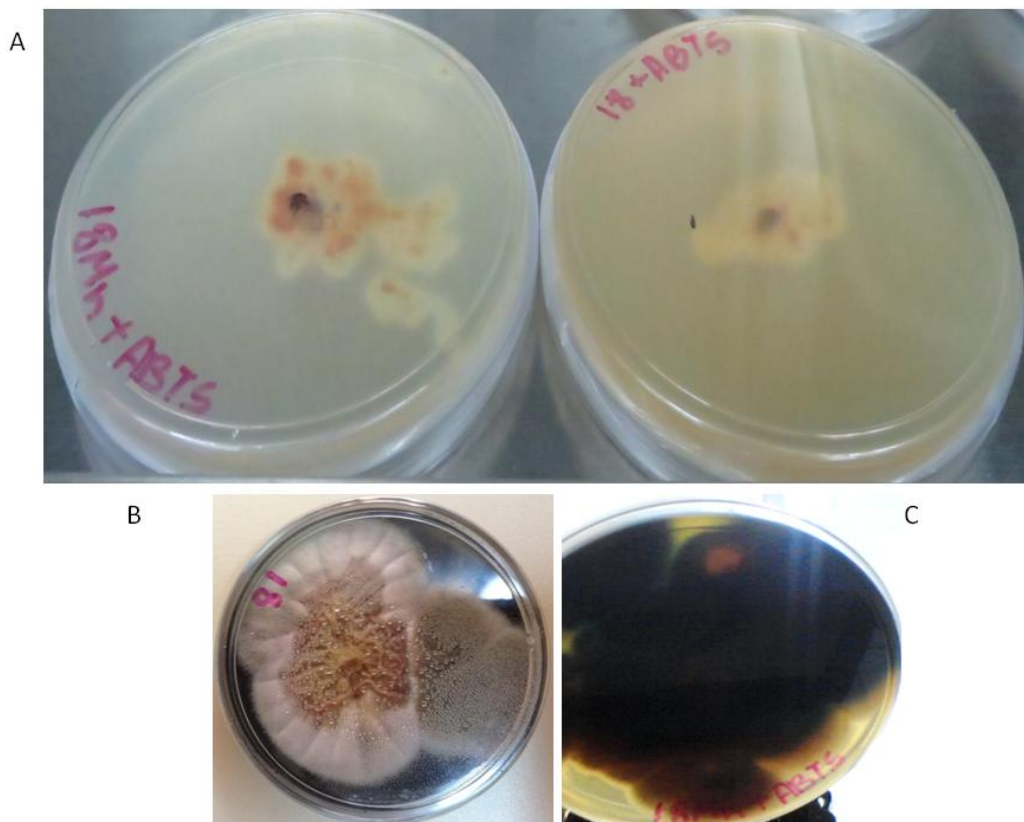


Figura 24: Atividade qualitativa da lacase em placa: A) a direita o isolado 18, identificado como *Penicillium* sp. crescendo na placa com ABTS e a esquerda o mesmo isolado suplementado com manganês na placa com ABTS, podemos ver pequena atividade na figura 10.a no centro de cada placa, cultura de 5 dias. B) Aspecto das hifas 18 sem Mn^{2+} – frente da placa cultura 16 dias, todo o meio apresenta uma coloração preto-azulada por causa da atividade da enzima. C) Aspecto das hifas 18 com Mn^{2+} - cultura com 16 dias, verso da placa mostrando a evidência de atividade enzimática pelo surgimento da coloração preto-azulada.

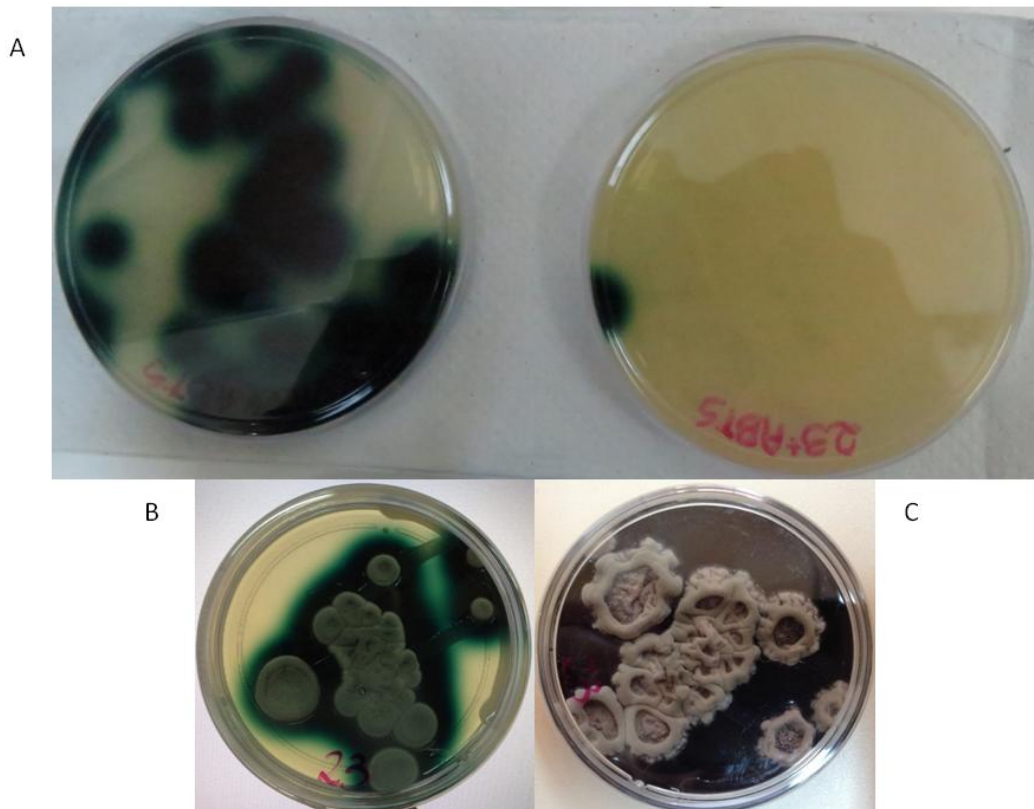


Figura 25: Atividade qualitativa da lacase em placa: A) a direita o isolado 23, crescendo na placa com ABTS e a esquerda o mesmo isolado suplementado com manganês na placa com ABTS com 3 dias de cultivo. B) Aspecto das hifas 23 sem Mn^{2+} – frente da placa cultura 5 dias, todo o meio apresenta uma coloração azul-esverdeada por causa da atividade da enzima. C) Aspecto das hifas 23 com Mn^{2+} - cultura com 15 dias, frente da placa mostrando a evidência de atividade enzimática pelo surgimento da coloração preto-azulada.



Figura 26: Atividade qualitativa da lacase em placa: a esquerda o isolado 26, identificado como *Aspergillus* sp. crescendo na placa com ABTS e a direita o mesmo isolado suplementado com manganês na placa com ABTS. A figura mostra a não presença da enzima extracelular devido à ausência de atividade.

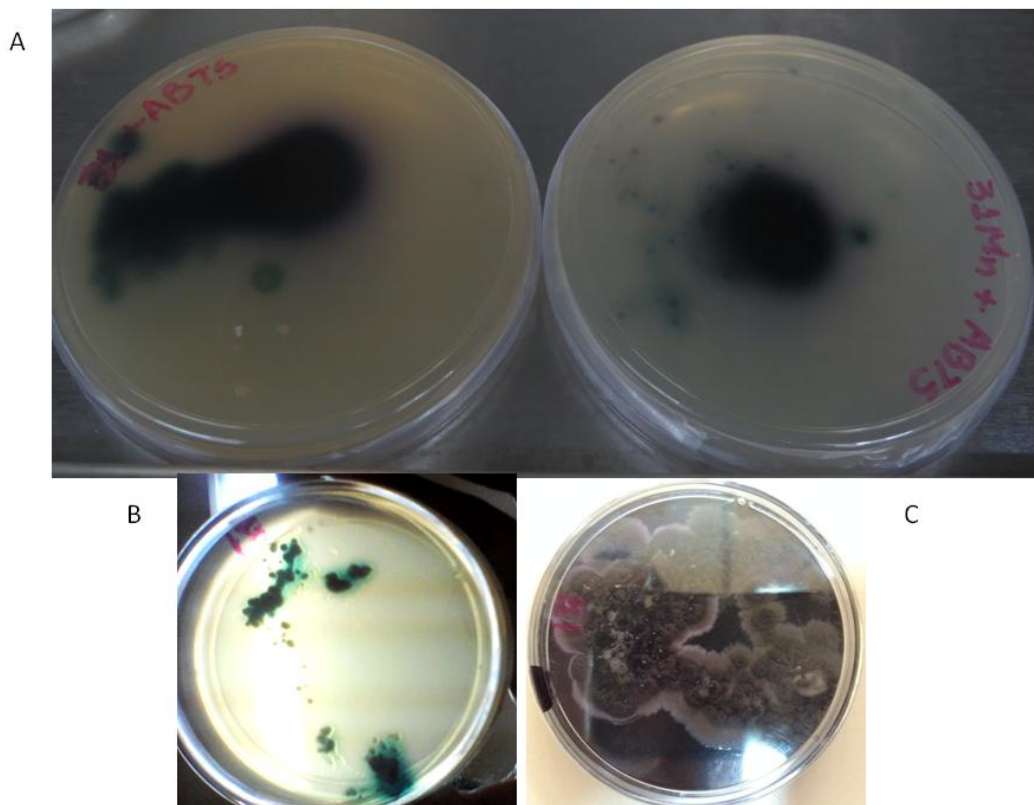


Figura 27: Atividade qualitativa da lacase em placa: A) a esquerda o isolado 31, identificado como *Cladosporium* sp. crescendo na placa com ABTS e a direita o mesmo isolado suplementado com manganês na placa com ABTS com 3 dias de cultivo. B) Aspecto das hifas 31 sem Mn^{2+} – frente da placa cultura 1.5 dias, o meio ao redor da hifa apresenta uma coloração azul-esverdeada por causa da atividade da enzima. C) Aspecto das hifas 31 com Mn^{2+} - cultura com 6 dias, frente da placa mostrando a evidência de atividade enzimática pelo surgimento da coloração preto-azulada.

4.9-Ensaio da atividade da lacase em diferentes concentrações de proteína

Os isolados que apresentaram evidência colorimétrica no teste qualitativo de presença e de ausência de lacases foram submetidos ao teste quantitativo. Foi feita a dosagem de proteínas e foi usada a mesma quantidade de proteínas para os três isolados, tanto os que cresceram na presença como os que cresceram na ausência de Mn^{2+} . Foram realizadas reações com 50, 100 e 200 μ g de proteína para os três isolados, as reações foram feitas em tampão ácido (acetato) na concentração de 0.1M.

A atividade enzimática da lacase foi maior nas reações feitas com extrato bruto do isolado 18 (inoculo que cresceu em ausência de manganês) e do isolado 18 Mn (inoculo que cresceu na presença de Mn). Não houve diferença significativa de atividade do isolado que cresceu na presença de Mn^{2+} para o isolado que cresceu na ausência de Mn^{2+} . Quando

a quantidade de proteína adicionada ao meio de reação era aumentada, a atividade também aumentava, tanto da reação feita com extrato do isolado 18 como da reação feita com extrato do isolado 18 Mn (Figura 28). Os isolados 18/18 Mn apresentaram uma atividade enzimática aproximadamente 3,5X maior que os isolados 23/23 Mn e aproximadamente 7X maior que a atividade dos isolados 31/31 Mn.

A atividade enzimática da lacase da reação feita com o extrato bruto do isolado 23 Mn (inoculo que cresceu na presença de Mn) foi maior que a atividade da lacase com o extrato do isolado 23 (inoculo que cresceu em ausência de Mn) como podemos ver na Figura 29. O teste de atividade enzimática em placa também mostrou maior atividade no isolado que cresceu em meio suplementado com Mn. As reações com 200 µg de proteína também mostraram maior atividade do que as reações com 100 e 50 µg de proteína, como esperado.

O isolado 31 Mn (inoculo que cresceu na presença de Mn) aparentemente não mostrou maior atividade enzimática da lacase que o isolado 31 (inoculo que cresceu em ausência de Mn), de acordo com a Figura 30. Tanto o isolado 31 com o 31 Mn mostraram maior atividade em 200 µg de proteína do que em 100 e 50 µg de proteína. Esse isolado foi o que apresentou menor atividade no ensaio quantitativo e foi o que apresentou maior atividade no ensaio qualitativo. As lacases presentes no extrato bruto do isolado 31 e 31 Mn podem ser mais específicas ao substrato ABTS por apresentarem uma atividade alta com 1,5 dias no ensaio em placa e apresentarem atividade bem menor no ensaio quantitativo.

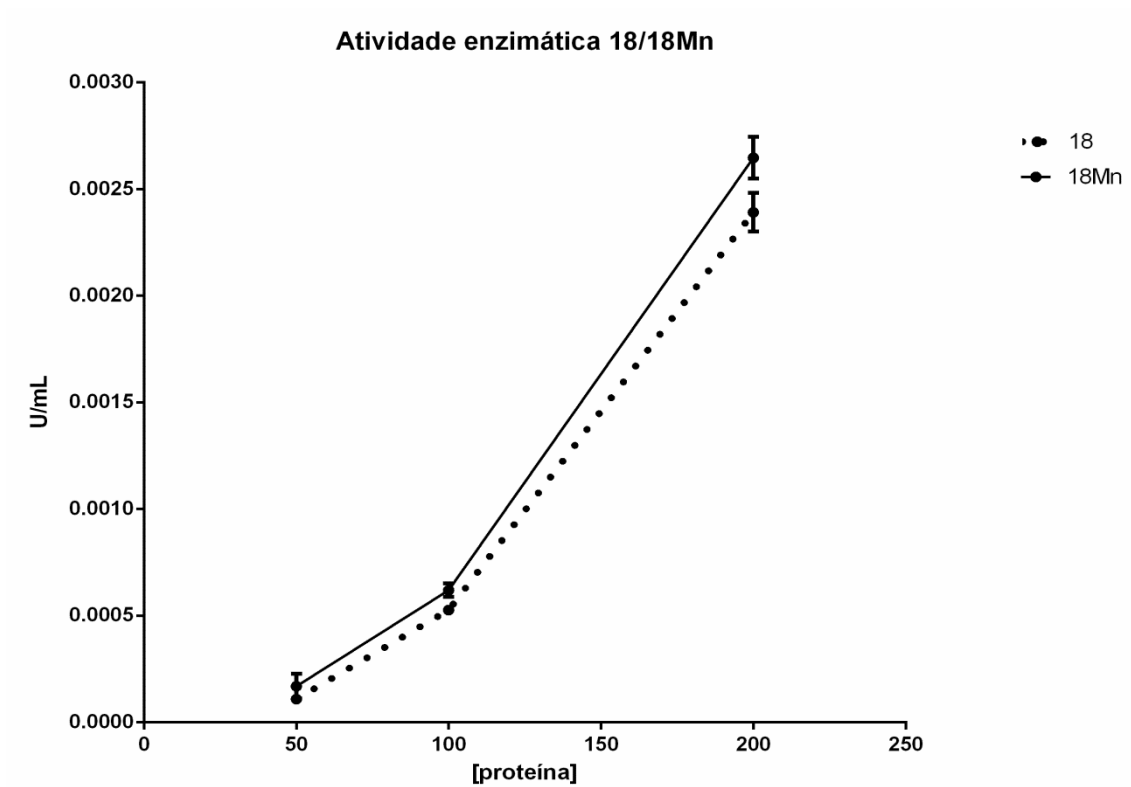


Figura 28: Isolado 18/18Mn – *Penicillium* sp.: reação de atividade de lacases em 50, 100 e 200 µg/mL de proteína em pH ácido.

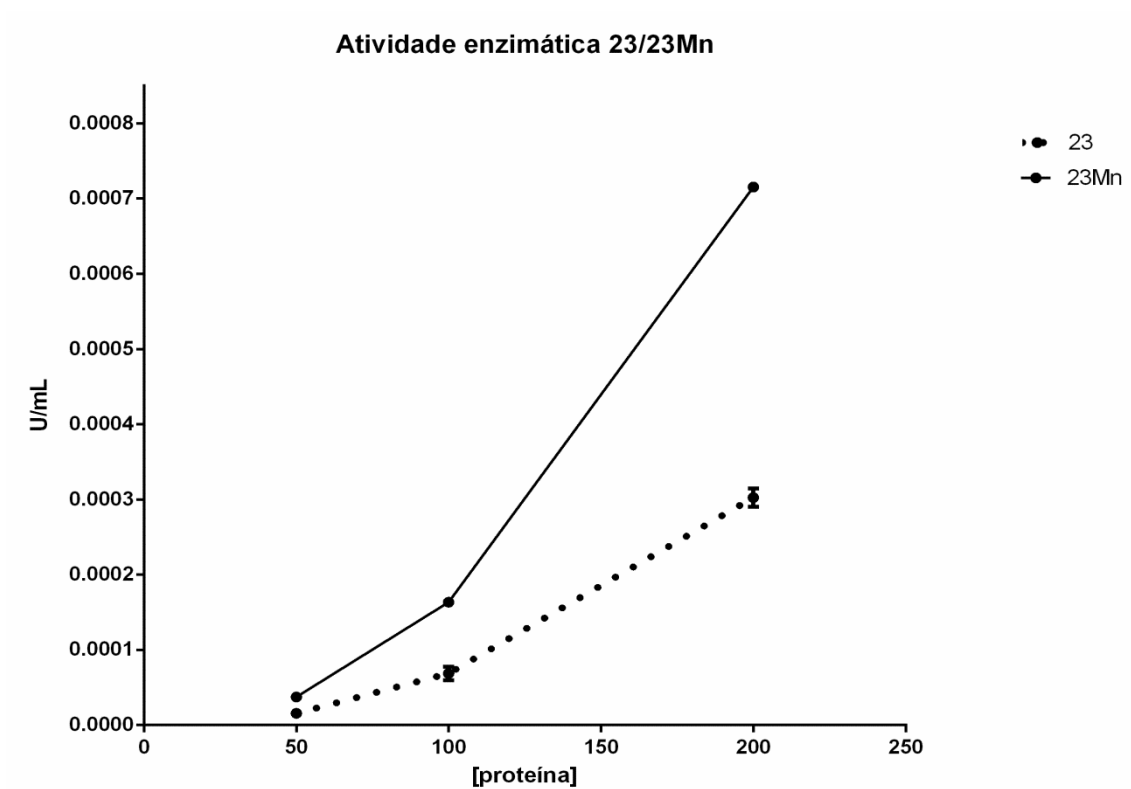


Figura 29: Isolado 23/23Mn: reação de atividade de lacases em 50, 100 e 200 µg/mL de proteína em pH ácido.

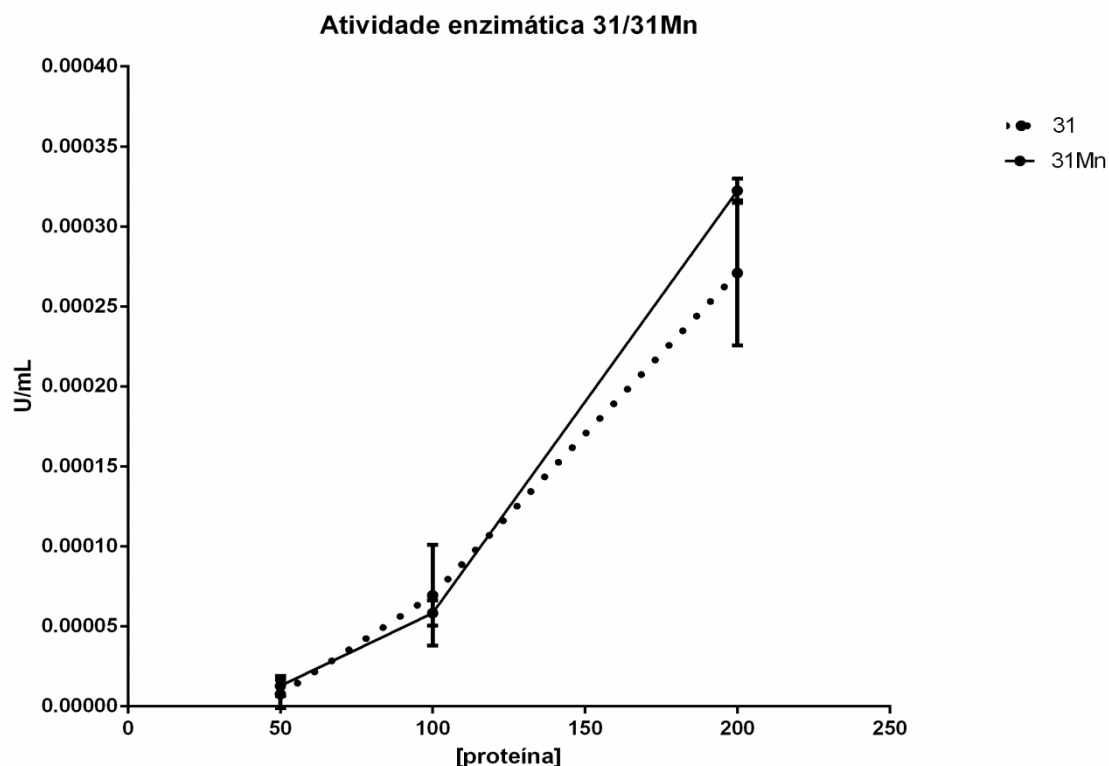


Figura 30: Isolado 31/31Mn- *Cladosporium* sp.: reação de atividade de lacases em 50, 100 e 200 µg/ml de proteína em pH ácido.

4.10-Identificação morfológica dos fungos

A identificação morfológica das estruturas reprodutivas dos isolados foi feita por microscopia eletrônica de varredura com o intuito de posteriormente comparar com a identificação molecular, para assim, termos maior segurança da identificação. As análises foram feitas com culturas de 8 a 14 dias assim como o ensaio enzimático, esse foi o período em que a maioria dos isolados iniciou efetivamente a remover manganês no ensaio de batelada com 140 mgL^{-1} de Mn^{2+} (dados não mostrados).

4.10.1- Microscopia eletrônica de Varredura

A Figura 31 mostra o isolado 7 que foi identificado tanto pelo sequenciamento como pela característica morfológica como *Hypocrea* sp. Podemos perceber que o aspecto das hifas de reprodução assexuada tanto no isolado crescido com 140 mgL^{-1} de Mn^{2+} como no isolado crescido na ausência de manganês apresentam o aspecto de *Hypocrea*, que é o estágio de reprodução assexuada de *Trichoderma* (Jaklitsch, 2011). A condição de

presença de Mn não causou estresse visível na aparência externa da hifa nem causou atraso ou adiantamento no tempo de formação das estruturas de reprodução. Leves rugosidades mostradas na hifa pela Figura 31 podem ter ocorrido devido ao processo de desidratação em série de etanol.

A Figura 32 mostra o isolado 18 crescido na presença e ausência de manganês. Podemos ver que esse isolado apresenta estruturas reprodutivas características de *Penicillium*, o resultado do sequenciamento corrobora o aspecto morfológico da hifa (Yilmaz *et al.*, 2012). Assim como o isolado 7, o isolado 18 não apresenta diferenças morfológicas ou de textura na condição de presença de manganês.

A Figura 33 mostra o isolado 23 crescido na presença de 140 mgL^{-1} de Mn^{2+} e sem suplementação de manganês, não ocorrem diferenças com a mudança de condição no aspecto das hifas de reprodução assexuada. Este isolado não apresentou uma sequência de DNA de qualidade, não foi feita filogenia molecular. A hifa de reprodução assexuada mostrada pela microscopia eletrônica é característica de espécies do gênero *Penicillium* sp (Yilmaz *et al.*, 2012).

A Figura 34 mostra o isolado 26 cultivado na presença de 140 mgL^{-1} de Mn^{2+} e na ausência, a presença do metal não ocasionou mudanças visíveis na forma das hifas ou aspecto externo das hifas. Esse isolado teve o sequenciamento corroborado pelo aspecto estruturas de reprodução assexuada da hifa, que são características do gênero *Aspergillus* sp.

A Figura 35 mostra o isolado 31 cultivado com 140 mgL^{-1} de Mn^{2+} e sem esse metal. Podemos ver que não ocorrem diferenças visíveis no aspecto externo da hifa causada pela presença do metal. As estruturas de reprodução assexuada são características de espécies do gênero *Cladosporium* sp., o sequenciamento confirma esse resultado (Dugan *et al.*, 2008).

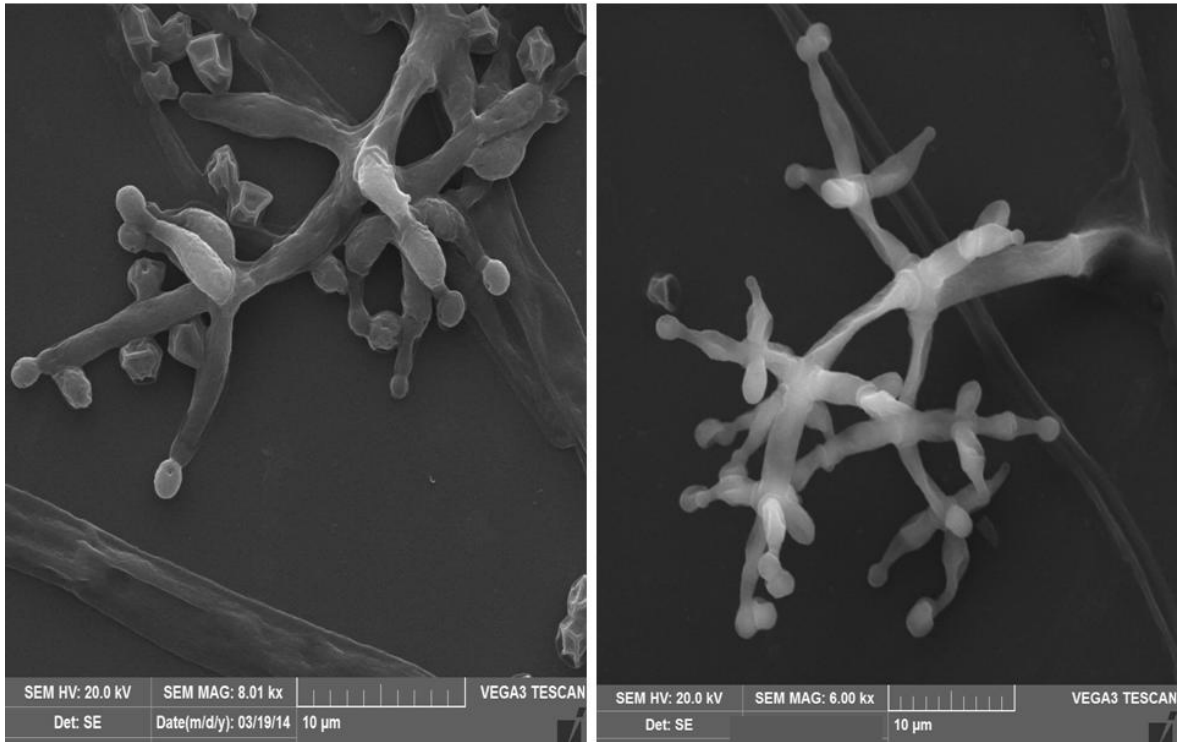


Figura 31: À esquerda *Hypocrea* sp. crescido na ausência de Mn^{2+} e à direita *Hypocrea* sp. crescido na presença de Mn^{2+} . Estrutura de reprodução assexuada. Aumento de 8000 e 6000X respectivamente.

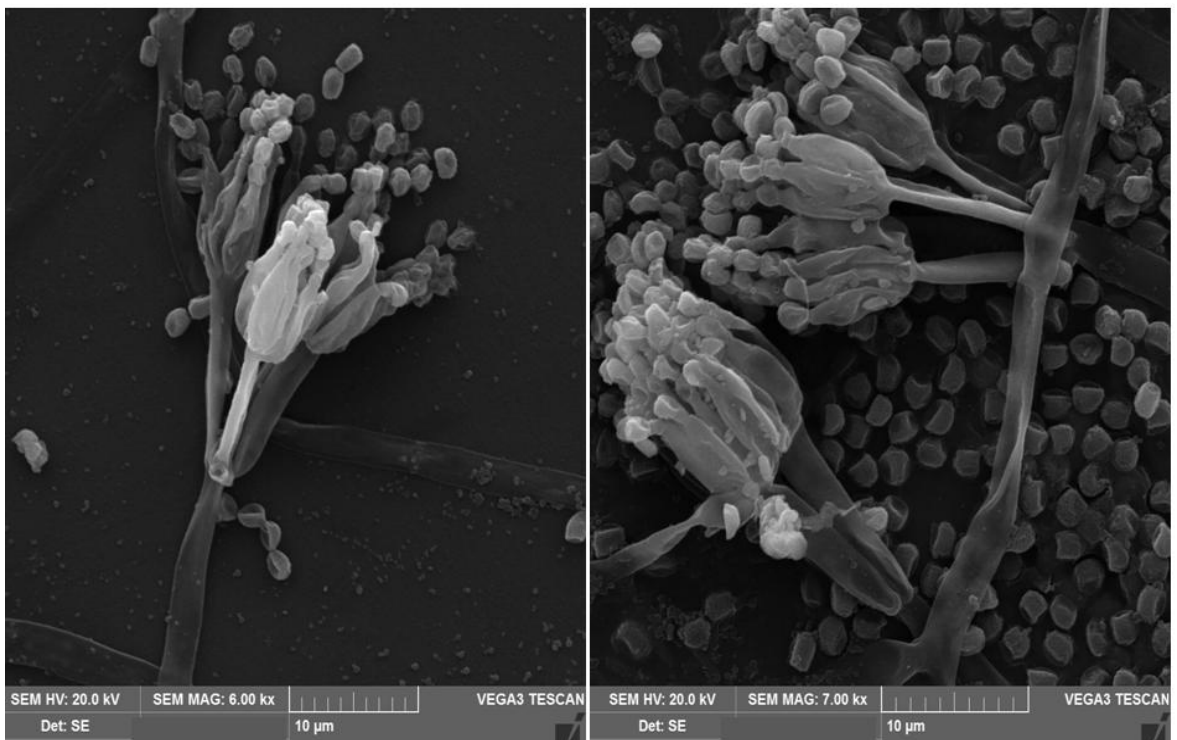


Figura 32: À esquerda *Penicillium* sp. crescido na ausência de Mn^{2+} e à direita *Penicillium* sp. crescido na presença de Mn^{2+} . Estrutura de reprodução assexuada. Aumento de 6000 e 7000X respectivamente.

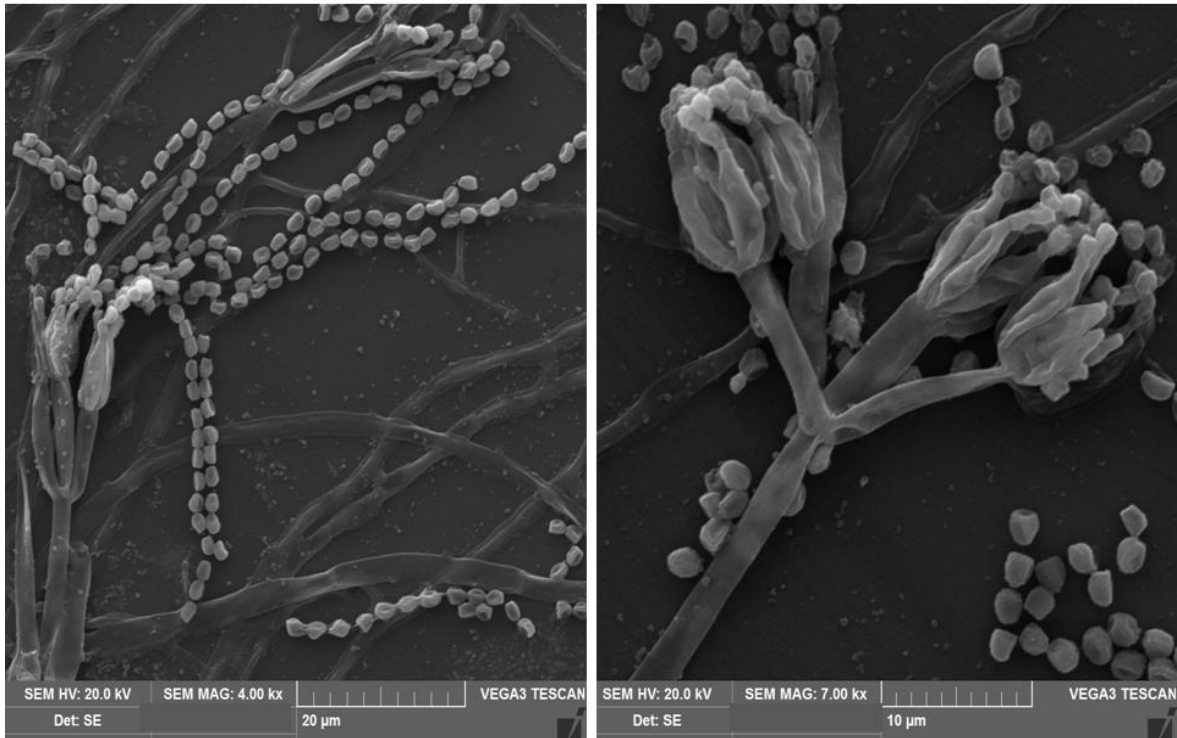


Figura 33: À esquerda, isolado 23 crescido na ausência de Mn^{2+} e à direita isolado 23 crescido na presença de Mn^{2+} Estrutura de reprodução assexuada. Aumento de 4000 e 7000X respectivamente.

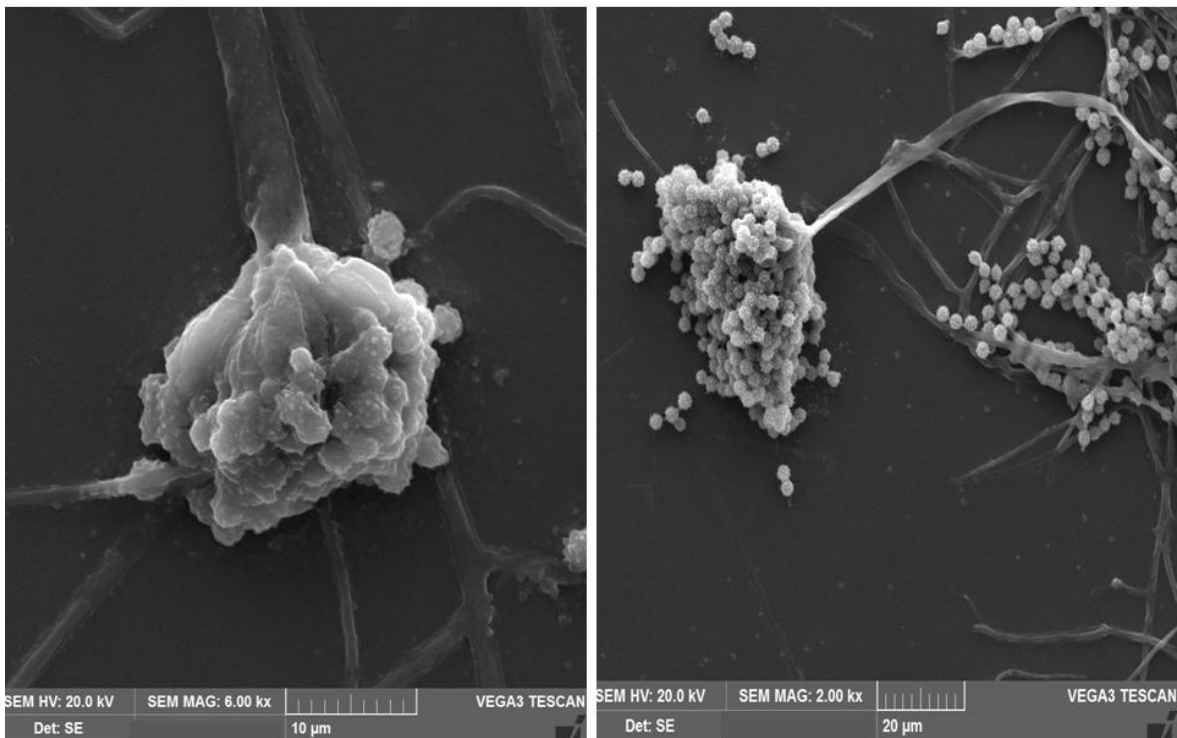


Figura 34: À esquerda *Aspergillus* sp. crescido na ausência de Mn^{2+} e à direita *Aspergillus* sp. crescido na presença de Mn^{2+} . Estrutura de reprodução assexuada. Aumento de 6000 e 2000X respectivamente.

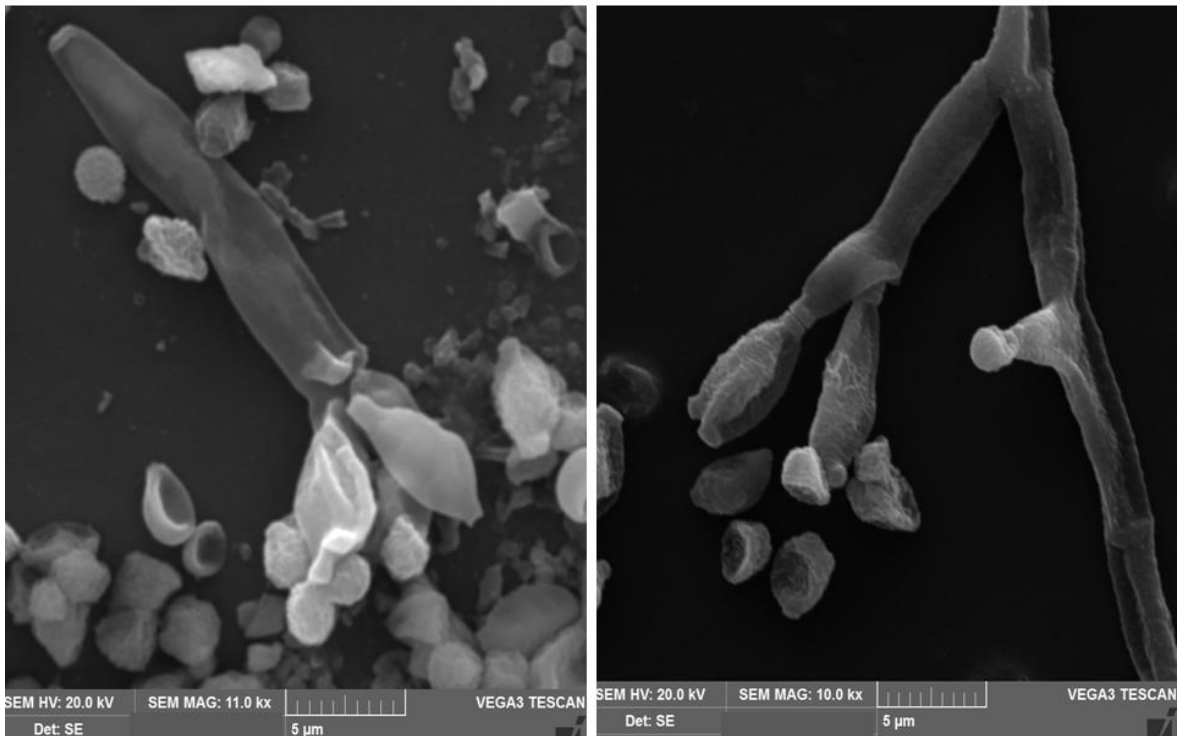


Figura 35: À esquerda *Cladosporium* sp. crescido na ausência de Mn^{2+} e à direita *Cladosporium* sp. crescido na presença de Mn^{2+} . Estrutura de reprodução assexuada. Aumento de 11000 e 10000X respectivamente.

4.10.2- EDS

Cada isolado foi submetido à microanálise por EDS, o mesmo isolado foi analisado na presença e ausência de manganês para a comparação da composição. Esse teste foi feito com o objetivo de descobrir se os isolados promovem biorremediação de manganês por mecanismos de adsorção na parede celular.

A Figura 36 que mostra a análise do fungo *Hypocrea* sp., os seguintes elementos foram encontrados na lâmina: o Al, K, Ca, Si, Mg, Na, O e C, o manganês não foi encontrado em quantidade maior que a de erro, o erro representa 0.1, representado pela letra σ no gráfico. Como não foi encontrado manganês na lâmina do isolado crescido na presença de manganês, podemos descartar como mecanismo de biorremediação a adsorção de Mn^{2+} na superfície externa da hifa.

O silício foi encontrado em todas as análises, pois a lâmina utilizada foi silanizada anteriormente à fixação das hifas. O oxigênio, magnésio, cálcio, potássio, carbono, sódio e cloro foram encontrados em grande parte das lâminas, esses elementos são constituintes das hifas. Essa análise não mostra a quantidade exata de cada elemento, mas fornece uma

noção qualitativa de composição e abundância dos principais elementos presentes na amostra.

Na Figura 37 podemos ver a análise do fungo *Penicillium* sp., assim como no isolado 7 não houve quantidade de manganês significativa de manganês adsorvido na superfície da hifa, o tempo de contato da hifa com o meio suplementado com manganês pode ter sido insuficiente (foi o mesmo tempo da análise de microscopia eletrônica de varredura, entre 8 e 14 dias). Os constituintes observados foram os mesmos.

A figura 38 mostra a análise do fungo 23 na presença e ausência de manganês. Assim como o fungo 18 não houve adsorção detectável de manganês na superfície da hifa no isolado que cresceu na condição de 140 mgL^{-1} de Mn^{2+} . O tempo de exposição ao metal pode ter sido pequeno ou insuficiente, visto que todos os isolados apresentaram uma taxa de remoção desse metal. O mecanismo de biorremoção do manganês pode ser causado por outros fatores.

A figura 39 mostra a análise do fungo *Aspergillus* sp., na presença e ausência de manganês. Nessa lâmina foi detectado abundância de fósforo, pode ser devido ao tampão fosfato adicionado durante a fixação da hifa. Não foi observada nenhuma quantidade significativa de manganês adsorvido na hifa, a quantidade e composição do restante dos elementos presentes na hifa estão similares aos outros isolados.

A figura 40 mostra a análise do fungo *Cladosporium* sp., o isolado que cresceu sem 140 mgL^{-1} de Mn^{2+} mostra 0% de manganês adsorvido, porém o isolado que cresceu suplementado com manganês apresentou 1,5% desse metal adsorvido na superfície da hifa com 8-14 dias de cultivo. Shao e Sun (2007) mostrou que fungo da espécie *Cladosporium cladosporioides* tem capacidade de adsorver manganês e de precipitá-lo internamente (visualizado pelo autor por meio de microscopia eletrônica de transmissão), como se trata do mesmo gênero, é possível que a adsorção e/ou internalização de manganês seja o mecanismo de biorremoção desempenhado por esse isolado.

Algumas espécies do gênero *Penicillium* e *Aspergillus* possuem capacidade de adsorver metais. Como citado anteriormente, o fungo *Aspergillus versicolor* é capaz de adsorver mercúrio, cromo, cobre e níquel (Das *et al.*, 2009; Taştan *et al.*, 2010). Tsekova *et al.* (2010) descreve a capacidade que *Aspergillus niger* tem de bioissorção de vários metais incluindo manganês.

O fungo *Cladosporium* sp., isolado 31 foi o único que apresentou adsorção de manganês e foi também o isolado que removeu o metal em meio líquido sem reduzir no ensaio paralelo. A análise de EDS foi feita em cultura sólida, pode ser que, se fossem

realizados ensaios em cultura líquida, seria possível detectar manganês na superfície da hifa de *Penicillium* sp.18 e *Aspergillus* sp. 26 e aumentar o tempo de cultivo anterior à preparação da lâmina também, visto que esses dois isolados apresentaram também altas taxas de remoção, cerca de 80 e 91% respectivamente.

A figura 41 mostra o mapeamento do elemento manganês pela superfície da lâmina, o local em que o elemento se encontra é onde estão os pontos vermelhos na imagem. Podemos ver que o isolado 31 apresenta pontos sobre a região das hifas, isso sugere a adsorção do metal. As imagens correspondem a dos isolados crescidos na presença de manganês. Essas imagens fornecem noção apenas da posição do elemento, a imagem que possui mais pontos vermelhos não é necessariamente a que possui maior quantidade de manganês, à medida que o tempo de exposição da amostra aumenta, também aumentam os pontos vermelhos na imagem. O gráfico do EDS que fornece a informação de qual elemento é mais abundante.

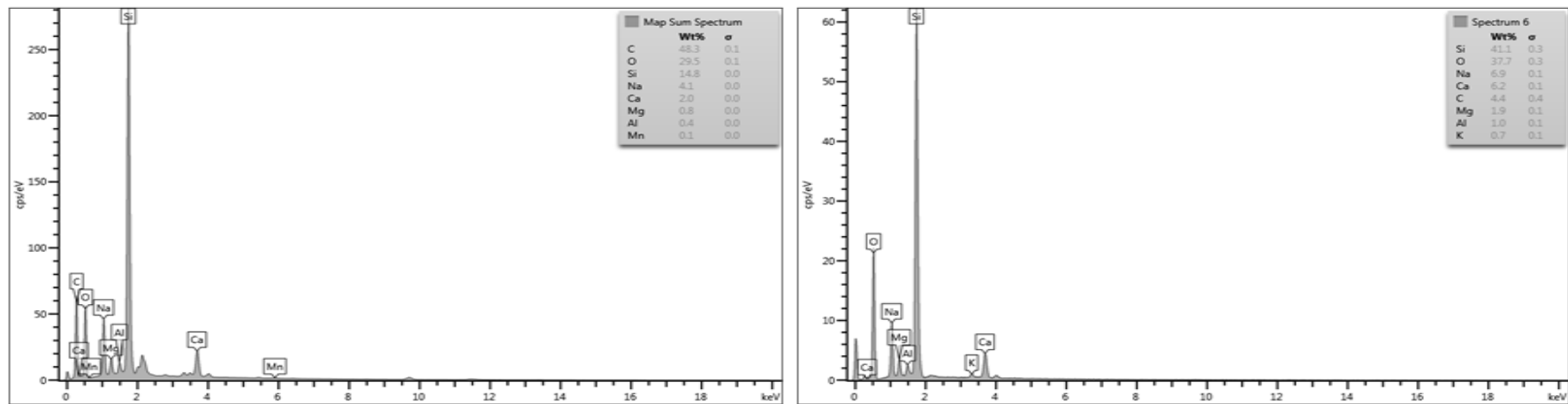


Figura 36: EDS: *Hypocrea sp. Mn* e *Hypocrea sp.*, nenhum manganês adsorvido na superfície da hifa.

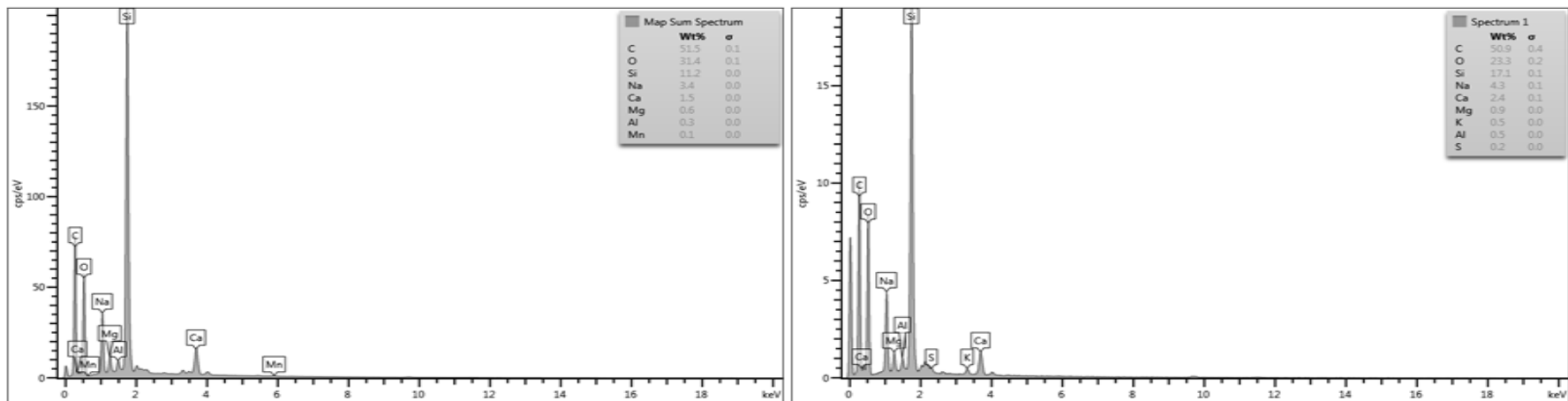


Figura 37: EDS: Fungo *Penicillium sp. Mn* e *Penicillium sp.*, nenhum manganês adsorvido na superfície da hifa.

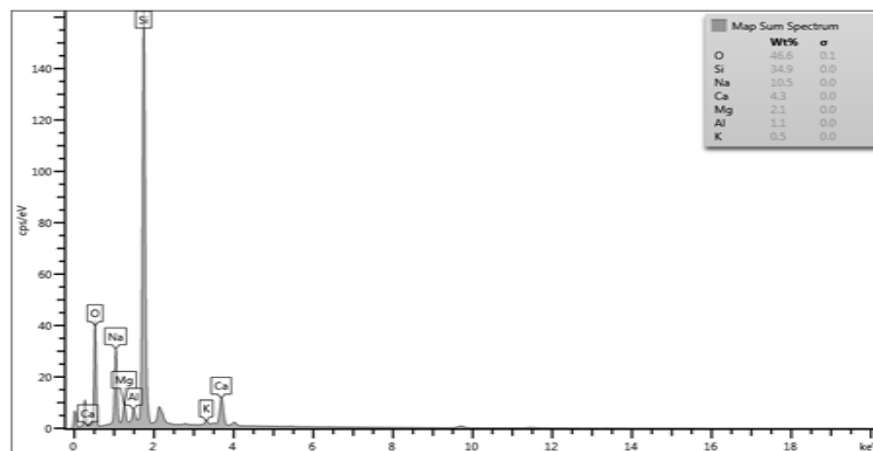
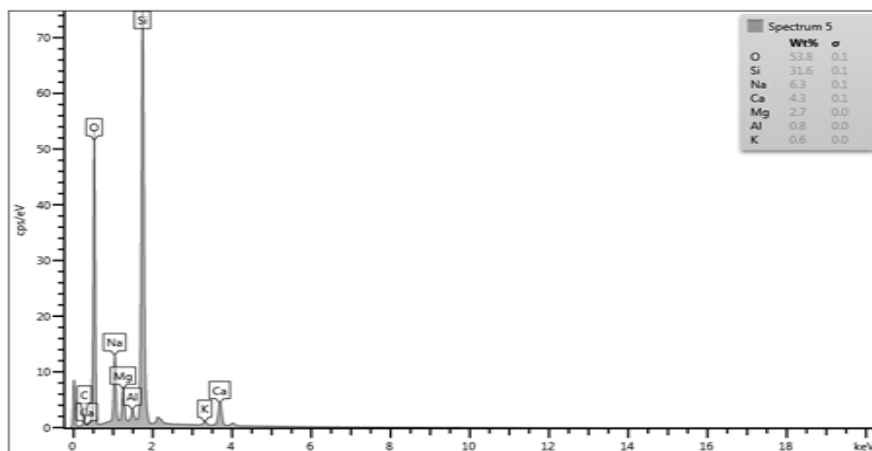


Figura 38: EDS: Fungo 23Mn e 23, nenhum manganês adsorvido na superfície da hifa.

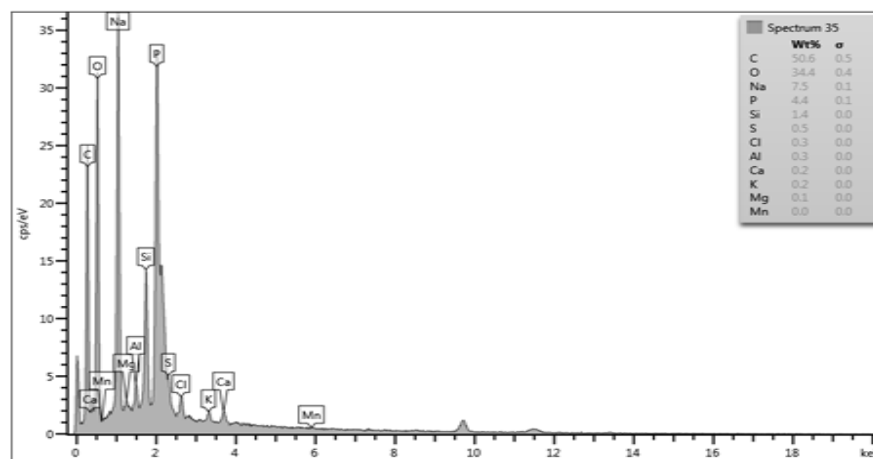
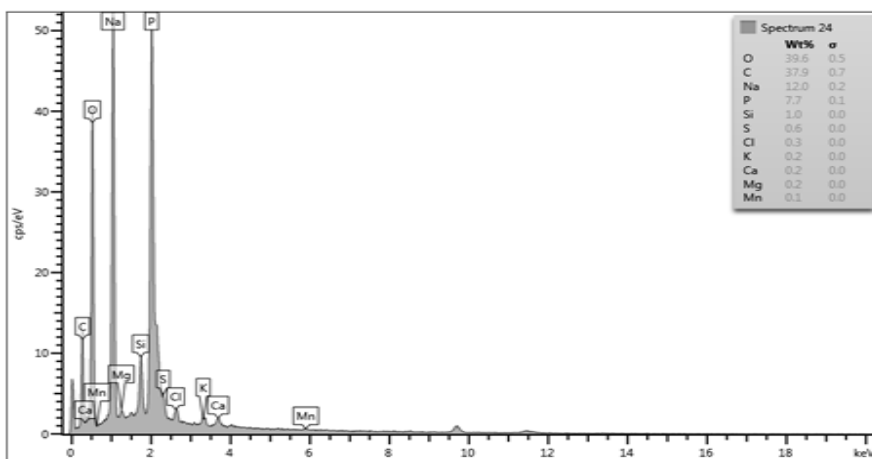


Figura 39: EDS: Fungo *Aspergillus* sp.Mn e *Aspergillus* sp., nenhum manganês adsorvido na superfície da hifa.

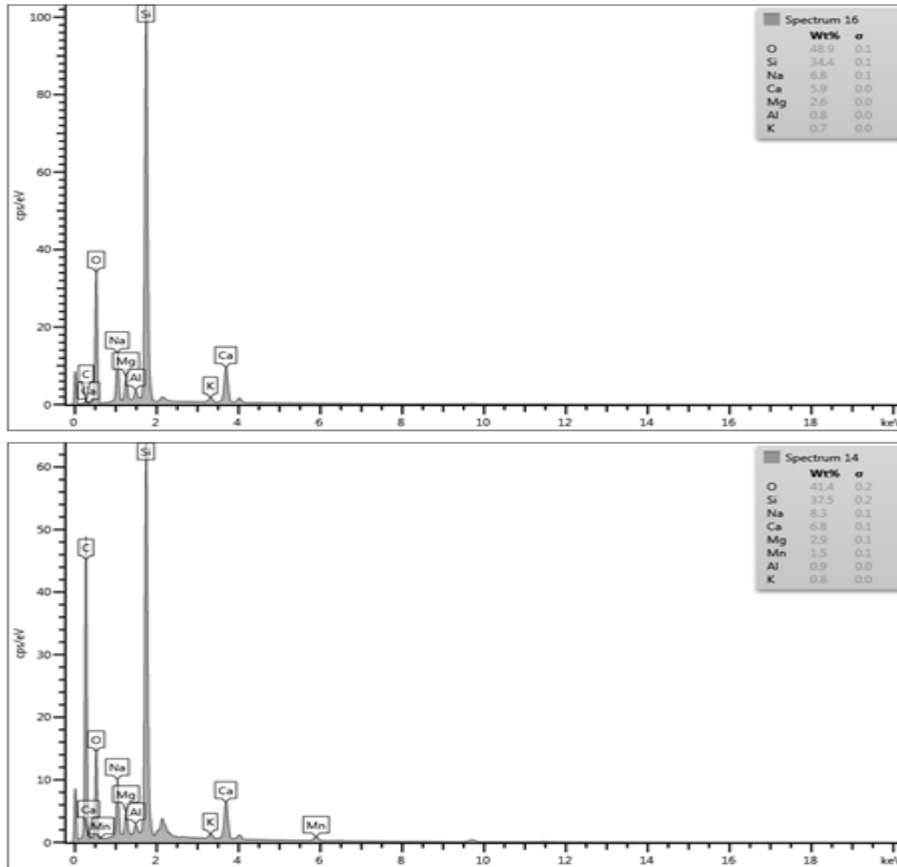


Figura 40: EDS: *Cladosporium* sp. e *Cladosporium* sp.Mn, nenhum manganês adsorvido na superfície da hifa.

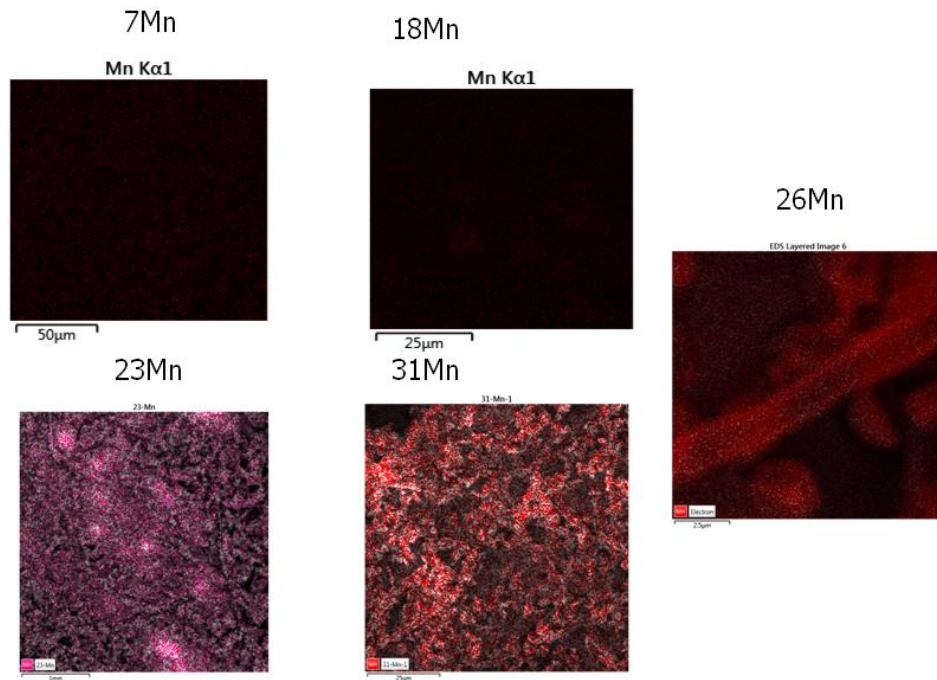


Figura 41: BSE: Mapeamento de manganês nos isolados 7(*Hypocrea* sp.), 18 (*Penicillium* sp.) , 23, 26(*Aspergillus* sp.) e 31 (*Cladosporium* sp.) crescidos na presença de manganês.

4.11-Ensaio para detecção da presença de óxidos manganês– Azul de Leucoberbelina (LBB)

O reagente LBB (N,N'-Dimetilamino-p,p'-trifenilmetano-o"- ácido sulfônico) é uma leucobase, trifenil (Figura 42) que permite a detecção de Mn^{3+} e Mn^{4+} . Não há a oxidação do reagente na presença de Mn^{2+} ou de manganês em outros estágios de oxidação que não sejam Mn^{4+} ou Mn^{3+} , não havendo assim, a formação da coloração azul. Este ensaio foi feito para verificar se o manganês que foi removido no experimento de batelada com 140 mgL^{-1} de Mn^{2+} foi oxidado a Mn^{4+} ou Mn^{3+} , ou se apenas foi precipitado na forma de $MnCO_3$ (Mn^{2+} insolúvel) (Krumbein e Altmann, 1973).

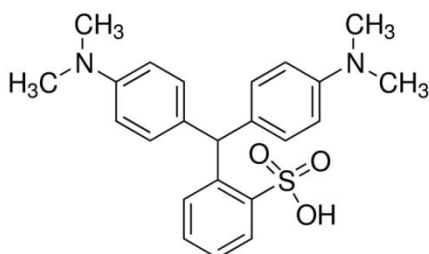


Figura 42: Estrutura química do Azul de leucoberbelina. Fonte: Sigma Aldrich.

Como descrito em Materiais e Métodos (item 3.11), o ensaio foi feito com o precipitado do meio de cultura que foi usado para dosagem de Mn^{2+} solúvel. O meio de cultura foi utilizado com a finalidade de demonstrar a presença de Mn^{4+} ou Mn^{3+} extracelulares e assim descartar o mecanismo de biorremocão por adsorção ou acúmulo intracelular.

Podemos ver na figura 43 a reação feita com bióxido de manganês (Mn^{4+}), que é o controle positivo. A reação foi feita com concentrações crescentes de bióxido (0,0001; 0,0005; 0,001; 0,01 e 0,05), podemos ver que o desenvolvimento de coloração azul é proporcional à concentração de óxido no meio de reação.



Figura 43: Ensaio LBB: controles realizados com várias concentrações de bióxido de manganês. Podemos ver da esquerda para a direita as seguintes concentrações: 0,0001mM, 0,0005mM, 0,001mM, 0,01mM e 0,05mM de bióxido de manganês PA, Sigma.

A figura 44 mostra a reação do LBB com aliquotas de meio de cultura de cinco semanas de cultivo. Podemos ver que houve formação de LBB oxidado em todas as semanas. Então podemos dizer que o isolado 7, fungo *Hypocrea* sp., oxida Mn^{2+} a Mn^{4+} ou Mn^{3+} . A remoção desempenhada por esse isolado não é simplesmente precipitação de Mn^{2+} em $MnCO_3$ (Mn^{2+} insolúvel).

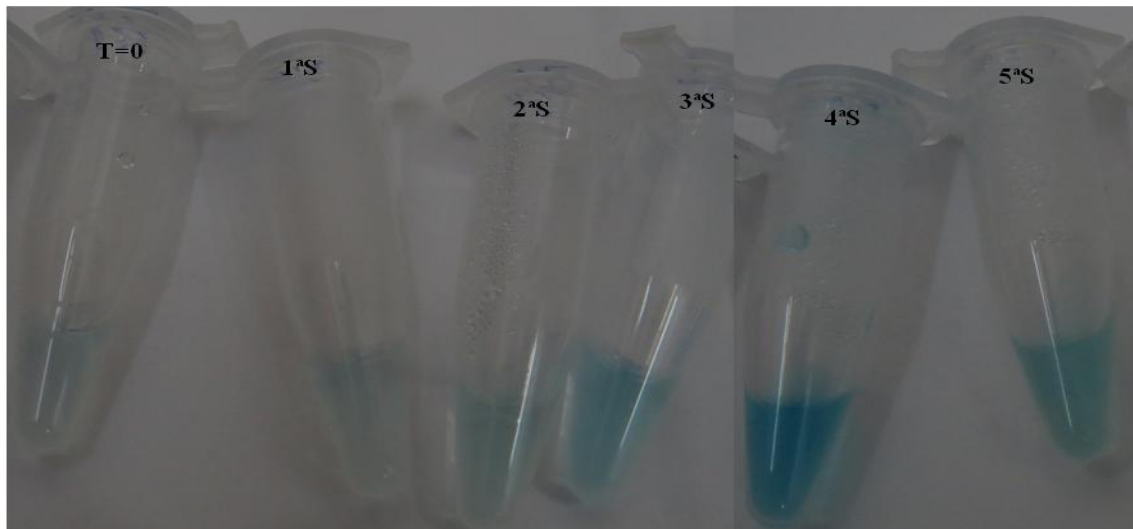


Figura 44: Ensaio LBB: Reação de óxidos de Mn^{3+} ou Mn^{4+} presentes no meio de cultura do isolado 7 *Hypocrea* sp. Podemos ver na da esquerda para a direita o tubo correspondente ao tempo zero (T=0), 1ª semana de cultivo – 7 dias (1ªS), 14 dias de cultivo (2ªS), 21 dias de cultivo (3ªS), 28 dias de cultivo (4ªS) e 35 dias de cultivo (5ªS).

A figura 45 mostra a reação do LBB com aliquotas de meio de cultura de cinco semanas de cultivo do isolado 18, *Penicillium* sp, cada frasco representa a alíquota de uma semana. Não houve detecção de manganês oxidado no meio de cultura em nenhuma das 5 semanas. Se esse isolado oxidar manganês, o manganês estará adsorvido na hifa ou estará internalizado, ou foi removido sem oxidação por precipitação em MnCO_3 .

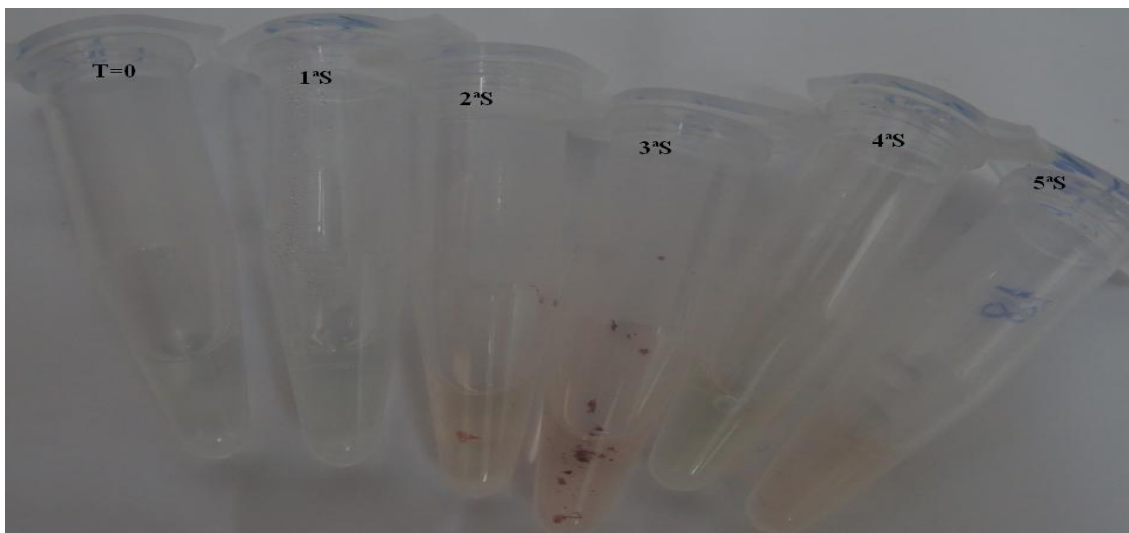


Figura 45: Ensaio LBB: O isolado 18 *Penicillium* sp. não apresenta óxidos de manganês suspensos no meio de cultura. Podemos ver na da esquerda para a direita o tubo correspondente ao tempo zero (T=0), 1ª semana de cultivo – 7 dias (1ªS), 14 dias de cultivo (2ªS), 21 dias de cultivo (3ªS), 28 dias de cultivo (4ªS) e 35 dias de cultivo (5ªS).

A figura 46 mostra a reação do LBB com aliquotas de meio de cultura de cinco semanas de cultivo do isolado 23, cada frasco representa a alíquota de uma semana. Não houve detecção de manganês oxidado no meio de cultura em nenhuma das 5 semanas. Se esse isolado oxidar manganês, o manganês estará adsorvido na hifa ou estará internalizado, apesar de esse isolado ter apresentado uma alta produção de lacase extracelular. Esse isolado pode ter removido o Mn^{2+} por precipitação em MnCO_3 .

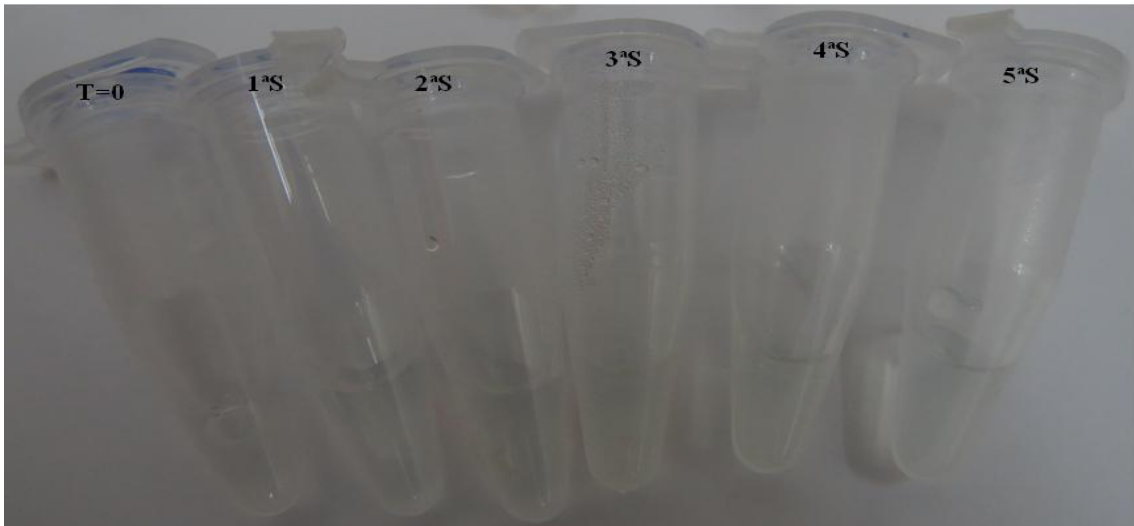


Figura 46: Ensaio LBB: O isolado 23 não apresenta óxidos de manganês suspensos no meio de cultura.

A figura 47 mostra a reação do LBB com aliquotas de meio de cultura de cinco semanas de cultivo do isolado 26, *Aspergillus* sp., cada frasco representa a alíquota de uma semana. Não houve detecção de manganês oxidado suspenso no meio de cultura em nenhuma das 5 semanas. Se esse isolado oxidar manganês, o manganês estará adsorvido na hifa ou estará internalizado, um EDS feito com hifas crescidas em meio líquido contendo manganês com mais dias de exposição deve ser feito, e uma microscopia eletrônica de transmissão para verificar se existem precipitados internos. Se não forem encontrados formas oxidadas de manganês na hifa, o mecanismo de remoção será provavelmente por uma simples precipitação de manganês como ocorre com o carbonato de manganês, Mn^{2+} insolúvel.

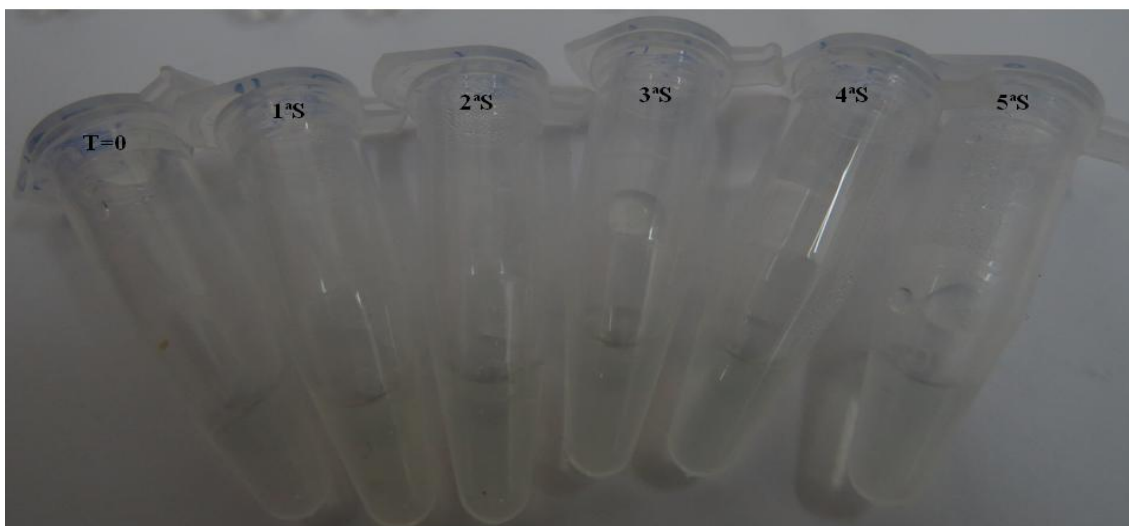


Figura 47: Ensaio LBB: O isolado 26 *Aspergillus* sp. não apresenta óxidos de manganês suspensos no meio de cultura.

A figura 48 mostra a reação do LBB com aliquotas de meio de cultura de cinco semanas de cultivo do isolado 31, *Cladosporium* sp. cada frasco representa a alíquota de uma semana. Não houve detecção de manganês oxidado suspenso no meio de cultura em nenhuma das 5 semanas. Esse isolado apresentou manganês adsorvido na superfície da hifa. Deve ser feita uma reação com as células e o reagente LBB para detectar se o manganês removido na parede celular está oxidado ou somente precipitado.

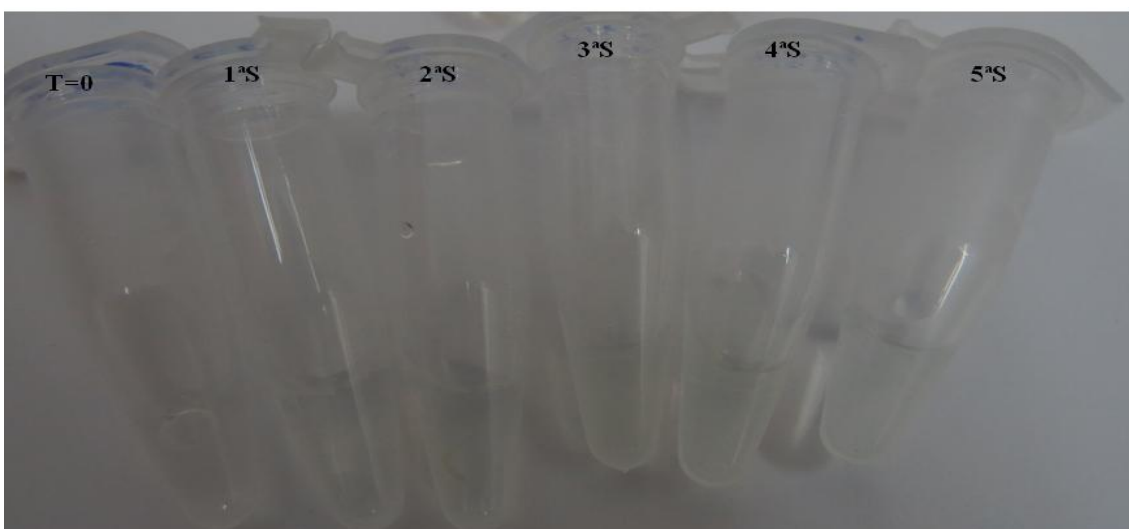


Figura 48: Ensaio LBB: O isolado 31 *Cladosporium* sp. não apresenta óxidos de manganês suspensos no meio de cultura.

Conclusões

A identificação molecular permitiu a detecção apenas dos gêneros dos isolados, a saber: o isolado 7 é uma espécie do gênero *Hypocrea* sp., o isolado 18 é do gênero *Penicillium* sp., o isolado 26 é do gênero *Aspergillus* sp. e o isolado 31 é do gênero *Cladosporium* sp. Os resultados de identificação molecular corroboram com a aparência morfológica observada na microscopia eletrônica de varredura.

Cladosporium foi o isolado mais eficiente na biorremediação de Mn^{2+} e o mecanismo de biorremediação é ocasionado por adsorção, como evidenciado pelas análises de EDS.

Os isolados 18, 23 e 31 apresentam enzimas lacases extracelulares que podem estar envolvidas no mecanismo de biorremediação de Mn^{2+} desempenhado por esses isolados.

O isolado 23 tem a produção de lacases aumentada na presença de Mn^{2+} . Provavelmente este fungo possui elementos que respondem a presença de metais na região promotora dos genes da enzima lacase.

O fungo *Hypocrea* sp. oxida Mn^{2+} em Mn^{3+} ou Mn^{4+} no meio de cultura por mecanismos desconhecidos, evidenciado pelo teste com LBB.

Perspectivas

- Testar a biorremocão de Mn^{2+} usando os mesmos isolados em meios de cultivo com fontes de carbono limitadas;
- Realizar novas análises de EDS, utilizando hifas dos fungos que cresceram em meio líquido contendo Mn^{2+} ;
- Realizar uma microscopia eletrônica de transmissão com *Cladosporium* sp., *Penicillium* sp e *Aspergillus* sp. e o isolado 23;
- Identificar o isolado 23.

Referências

ACHARYA, C.; KAR, R. N.; SUKLA, L. B. Studies on reaction mechanism of bioleaching of manganese ore. **Minerals Engineering**, v. 16, n. 10, p. 1027-1030, 2003. ISSN 0892-6875. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0892687503002395> >.

ANAHID, S.; YAGHMAEI, S.; GHOBADINEJAD, Z. Heavy metal tolerance of fungi. **Scientia Iranica**, v. 18, n. 3, p. 502-508, 2011. ISSN 1026-3098. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1026309811000800> >.

BALDRIAN, P. Fungal laccases - occurrence and properties. **FEMS Microbiol Rev**, v. 30, n. 2, p. 215-42, 2006. ISSN 0168-6445 (Print) 0168-6445 (Linking).

BAYTAK, S.; TÜRKER, A. R. The use of *Agrobacterium tumefaciens* immobilized on Amberlite XAD-4 as a new biosorbent for the column preconcentration of iron(III), cobalt(II), manganese(II) and chromium(III). **Talanta**, v. 65, n. 4, p. 938-945, 2005. ISSN 0039-9140. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914004005065> >.

BENDER, J. et al. Removal of zinc and manganese from contaminated water with cyanobacteria mats. **Water Environment Research**, v. 66, n. 5, p. 679-683, 2009.

BRUINS, J. H. et al. Biological and physico-chemical formation of Birnessite during the ripening of manganese removal filters. **Water Research**, v. 69, n. 0, p. 154-161, 2015. ISSN 0043-1354. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135414007891> >.

BURFORD, E. P.; KIERANS, M.; GADD, G. M. Geomycology: fungi in mineral substrata. **Mycologist**, v. 17, n. 3, p. 98-107, 2003. ISSN 0269-915X. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0269915X03003112> >.

BURGSTALLER; WOLFGANG; SCHINNER, F. Leaching of metals with fungi. **Journal of Biotechnology**, v. 27, n. 2, p. 91-116, 1993. ISSN 0168-1656. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/016816569390101R> >.

CHANG, J. et al. Fungal Mn oxides supporting Mn(II) oxidase activity as effective Mn(II) sequestering materials. **Environmental Technology**, v. 34, n. 19, p. 2781-2787, 2013/10/01 2013. ISSN 0959-3330. Disponível em: <
<http://dx.doi.org/10.1080/09593330.2013.790066> >. Acesso em: 2015/01/22.

CHANG, J. et al. Cobalt(II) sequestration on fungal biogenic manganese oxide enhanced by manganese(II) oxidase activity. **Applied Geochemistry**, v. 37, n. 0, p. 170-178, 2013. ISSN 0883-2927. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0883292713002035> >.

COORDINATORS, N. R. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. Database issue, p. D8-D20, 2013. ISSN 0305-1048
1362-4962. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3531099/> >.

DAS, S. K.; DAS, A. R.; GUHA, A. K. Adsorption behavior of mercury on functionalized *Aspergillus versicolor* mycelia: atomic force microscopic study. **Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids**, v. 25, n. 1, p. 360-366, 2009/01// 2009. ISSN 0743-7463. Disponível em: < <http://europepmc.org/abstract/MED/19115871>
<http://dx.doi.org/10.1021/la802749t> >.

DHAKAR, K. et al. Prolonged Laccase Production by a Cold and pH Tolerant Strain of *Penicillium pinophilum* (MCC 1049) Isolated from a Low Temperature Environment. **Enzyme Research**, v. 2014, p. 6, 2014. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1155/2014/120708> >.

DUGAN, F. M. et al. Morphological plasticity in *Cladosporium sphaerospermum*. **Persoonia : Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 21, p. 9-16, 2008. ISSN 0031-5850
1878-9080. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2846128/> >.

EGERTON, R. **Physical Principles of Electron Microscopy: An Introduction to TEM, SEM, and AEM**. Springer, 2005. ISBN 9780387258003. Disponível em: < <http://books.google.com.br/books?id=t6TTgqp3O5MC> >.

FUNGARO, D. A.; IZIDORO, J. D. C. Remediação de drenagem ácida de mina usando zeólitas sintetizadas a partir de cinzas leves de carvão. **Química Nova**, v. 29, p. 735-740, 2006. ISSN 0100-4042. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422006000400019&nrm=iso >.

GADD, G. M. Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation. **Geoderma**, v. 122, n. 2-4, p. 109-119, 2004. ISSN 0016-7061. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016706104000060> >.

_____. Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation. **Mycological Research**, v. 111, n. 1, p. 3-49, 2007. ISSN 0953-7562. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0953756206003364> >.

GADD, G. M. Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. **Microbiology**, v. 156, n. 3, p. 609-643, March 1, 2010 2010. Disponível em: < <http://mic.sgmjournals.org/content/156/3/609.abstract> >.

GARDES, M.; BRUNS, T. D. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. **Molecular Ecology**, v. 2, n. 2, p. 113-118, 1993.

GARNHAM, G. W.; CODD, G. A.; GADD, G. M. Accumulation of cobalt, zinc and manganese by the estuarine green microalga *Chlorella salina* immobilized in alginate

microbeads. **Environmental Science & Technology**, v. 26, n. 9, p. 1764-1770, 1992/09/01 1992. ISSN 0013-936X. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/es00033a008> >. Acesso em: 2015/01/23.

GAVRILESCU, M. Removal of Heavy Metals from the Environment by Biosorption. **Engineering in Life Sciences**, v. 4, n. 3, p. 219-232, 2004. ISSN 1618-2863. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/elsc.200420026> >.

GORBACHEVA, M. et al. Enzymatic oxidation of manganese ions catalysed by laccase. **Bioorg Chem**, v. 37, n. 1, p. 1-5, Feb 2009. ISSN 1090-2120 (Electronic) 0045-2068 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18976793> >.

HANSEL, C. M. et al. Mn(II) oxidation by an ascomycete fungus is linked to superoxide production during asexual reproduction. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 31, p. 12621-12625, 2012. ISSN 0027-8424 1091-6490. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3412038/> >.

JAKLITSCH, W. M. European species of *Hypocrea* Part I. The green-spored species. **Studies in Mycology**, v. 63, n. 0, p. 1-91, 2009. ISSN 0166-0616. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166061614600907> >.

_____. European species of *Hypocrea* part II: species with hyaline ascospores. **Fungal Diversity**, Dordrecht, v. 48, n. 1, p. 1-250, 2011. ISSN 1560-2745 1878-9129. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3189789/> >.

JANUSZ, G. et al. Fungal laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase: Gene expression and regulation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 52, n. 1, p. 1-12, 2013. ISSN 0141-0229. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141022912001718> >.

JOHNSON, D. B.; HALLBERG; B., K. Acid mine drainage remediation options: a review. **Science of The Total Environment**, v. 338, n. 1-2, p. 3-14, 2005. ISSN 0048-9697. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969704006199> >.

KRUMBEIN, W. E.; ALTMANN, H. J. A new method for the detection and enumeration of manganese oxidizing and reducing microorganisms. **Helgoländer wissenschaftliche Meeresuntersuchungen**, v. 25, n. 2-3, p. 347-356, 1973/09/01 1973. ISSN 0017-9957. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/BF01611203> >.

KUNAMNENI, A. et al. Laccases and their applications: A patent review. **Recent Patent Biotechnol**, v. 2, p. 10 - 24, 2008.

LEARMAN, D. R. et al. Constraints on superoxide mediated formation of manganese oxides. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 262, 2013. ISSN 1664-302X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3760088/> >.

LUAN, F. et al. Defining manganese(II) removal processes in passive coal mine drainage treatment systems through laboratory incubation experiments. **Applied Geochemistry**, v.

27, n. 8, p. 1567-1578, 2012. ISSN 0883-2927. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0883292712000959> >.

MADHAVI; VERNEKAR; LELE, S. S. **Laccase: Properties and Applications**. 2009. ISBN 1930-2126. Disponível em: < http://ojs.cnr.ncsu.edu/index.php/BioRes/article/view/BioRes_04_4_1694_Madhavi_Lele_Laccase_Props_Applications_Rev >.

MANDER, G. J. et al. Use of Laccase as a Novel, Versatile Reporter System in Filamentous Fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 7, p. 5020-5026, 2006. ISSN 0099-2240 1098-5336. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1489370/> >.

MEHTA, K. D.; DAS, C.; PANDEY, B. D. Leaching of copper, nickel and cobalt from Indian Ocean manganese nodules by *Aspergillus niger*. **Hydrometallurgy**, v. 105, n. 1-2, p. 89-95, 2010. ISSN 0304-386X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304386X10002288> >.

MIYATA, N. et al. Production of Biogenic Manganese Oxides by Anamorphic Ascomycete Fungi Isolated from Streambed Pebbles. **Geomicrobiology Journal**, v. 23, n. 2, p. 63-73, 2006. Disponível em: < <http://www.ingentaconnect.com/content/tandf/ugmb/2006/00000023/00000002/art00001> <http://dx.doi.org/10.1080/01490450500533809> >.

MORE, S. S. et al. Isolation, Purification, and Characterization of Fungal Laccase from *Pleurotus* sp. **Enzyme Research**, v. 2011, p. 7, 2011. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.4061/2011/248735> >.

MUKHERJEE, A. et al. RECENT DEVELOPMENTS IN PROCESSING OCEAN MANGANESE NODULES—A CRITICAL REVIEW. **Mineral Processing and Extractive Metallurgy Review**, v. 25, n. 2, p. 91-127, 2004/04/01 2004. ISSN 0882-7508. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1080/08827500490433188> >. Acesso em: 2015/01/23.

NGUYEN, V. A. T. et al. Multiple tolerance of *Rhodotorula glutinis* R-1 to acid, aluminum ion and manganese ion, and its unusual ability of neutralizing acidic medium. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 92, n. 4, p. 366-371, 2001. ISSN 1389-1723. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1389172301802413> >.

PACINI, V. A.; MARÍA INGALLINELLA, A.; SANGUINETTI, G. Removal of iron and manganese using biological roughing up flow filtration technology. **Water Research**, v. 39, n. 18, p. 4463-4475, 2005. ISSN 0043-1354. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135405004586> >.

PANT, D.; ADHOLEYA, A. Identification, Ligninolytic Enzyme Activity and Decolorization Potential of Two Fungi Isolated from a Distillery Effluent Contaminated Site. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 183, n. 1-4, p. 165-176, 2007/07/01 2007. ISSN 0049-6979. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s11270-007-9366-4> >.

PEVSNER, J. **Bioinformatics and Functional Genomics**. Wiley, 2009. ISBN 9780470451489. Disponível em: < <http://books.google.com.br/books?id=Emr0ZABQUAIC> >.

PISCITELLI, A. G., PAOLA; LETTERA, VINCENZO; PEZZELLA, CINZIA; SANNIA, GIOVANNI; FARACO, VINCENZA. Induction and Transcriptional Regulation of Laccases in Fungi. **Current Genomics**, v. 12, n. 2, p. 104-112, 2011. ISSN 1389-2029 1875-5488. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3129044/> >.

SALVADORI, M. R. et al. Biosynthesis and Uptake of Copper Nanoparticles by Dead Biomass of *Hypocrea lixii* Isolated from the Metal Mine in the Brazilian Amazon Region. **PLoS ONE**, San Francisco, USA, v. 8, n. 11, p. e80519, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3840023/> >.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. ISBN 9780879693091. Disponível em: < <http://books.google.com.br/books?id=G5RqAAAAMAAJ> >.

SANGER, F.; COULSON, A. R. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. **Journal of Molecular Biology**, v. 94, n. 3, p. 441-448, 1975. ISSN 0022-2836. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0022283675902132> >.

SANTELLI, C. M. et al. Promotion of Mn(II) Oxidation and Remediation of Coal Mine Drainage in Passive Treatment Systems by Diverse Fungal and Bacterial Communities. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 14, p. 4871-4875, 2010. ISSN 0099-2240 1098-5336. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2901711/> >.

SASAKI, K. K., HIDETAKA; ENDO, MAI; TAKANO, KEISHI. Removal of Mn(II) ions from aqueous neutral media by manganese-oxidizing fungus in the presence of carbon fiber. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 85, n. 5, p. 489-496, 2004. ISSN 1097-0290. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/bit.10921> >.

SASAKI, K. M., MINORU; HIRAJIMA, TSUYOSHI; TAKANO, KEISHI; KONNO, HIDETAKA. Immobilization of Mn(II) Ions by a Mn-Oxidizing Fungus *Paraconiothyrium* sp.-Like Strain at Neutral pHs. **MATERIALS TRANSACTIONS**, v. 47, n. 10, p. 2457-2461, 2006.

SASAKI, K. T., HIDEKI; OGAWA, YUUKI; KONNO, HIDETAKA. Optimum pH for Oxidation of Mn(II) Ions in Model and Actual Manganese Drainages by a Mn-Oxidizing Fungus, *Phoma* sp. Strain KY-1. **MATERIALS TRANSACTIONS**, v. 49, n. 4, p. 845-849, 2008.

SAY, R.; YILMAZ, N.; DENIZLI, A. Removal of Chromium(VI) Ions from Synthetic Solutions by the Fungus *Penicillium purpurogenum*. **Engineering in Life Sciences**, v. 4, n. 3, p. 276-280, 2004. ISSN 1618-2863. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/elsc.200420032> >.

SAY, R.; YILMAZ, N.; DENIZLI, A. Biosorption of Cadmium, Lead, Mercury, and Arsenic Ions by the Fungus *Penicillium purpurogenum*. **Separation Science and Technology**, v. 38, n. 9, p. 2039-2053, 2003/01/05 2003. ISSN 0149-6395. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1081/SS-120020133> >. Acesso em: 2015/01/23.

SCHERER, M.; FISCHER, R. Purification and characterization of laccase II of *Aspergillus nidulans*. **Archives of Microbiology**, v. 170, n. 2, p. 78-84, 1998/07/01 1998. ISSN 0302-8933. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s002030050617> >.

SCHLOSSER, D.; HOFER, C. Laccase-catalyzed oxidation of Mn^{2+} in the presence of natural Mn^{3+} chelators as a novel source of extracellular H_2O_2 production and its impact on manganese peroxidase. **Appl Environ Microbiol**, v. 68, n. 7, p. 3514-21, Jul 2002. ISSN 0099-2240 (Print) 0099-2240 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12089036> >.

SHAO, Z.; SUN, F. Intracellular sequestration of manganese and phosphorus in a metal-resistant fungus *Cladosporium cladosporioides* from deep-sea sediment. **Extremophiles**, v. 11, n. 3, p. 435-443, 2007/05/01 2007. ISSN 1431-0651. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00792-006-0051-0> >.

SILVA, A. M. et al. Treatment of high-manganese mine water with limestone and sodium carbonate. **Journal of Cleaner Production**, v. 29–30, n. 0, p. 11-19, 2012. ISSN 0959-6526. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959652612000522> >.

SINHA, A.; KHARE, S. K. **Manganese: Its Speciation, Pollution and Microbial Mitigation**. 2013. ISBN 2091-2609[escape]. Disponível em: < <http://nepjol.info/index.php/IJASBT/article/view/9164> >.

SOUREN, A. W. M. G. **Comment on "Oxidation of cobalt and manganese in seawater via a common microbially catalyzed pathway" by J.W. Moffett and J. Ho. [Geochimica et Cosmochimica Acta 60, 3415-3424, 1996]**. 1998.

SU, J. et al. CotA, a Multicopper Oxidase from *Bacillus pumilus* WH4, Exhibits Manganese-Oxidase Activity. **PLoS ONE**, San Francisco, USA, v. 8, n. 4, p. e60573, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3618234/> >.

TAKANO, K. et al. Phylogenetic analysis of manganese-oxidizing fungi isolated from manganese-rich aquatic environments in Hokkaido, Japan. **Limnology**, v. 7, n. 3, p. 219-223, 2006/12/01 2006. ISSN 1439-8621. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s10201-006-0177-x> >.

TAMAYO RAMOS, J. et al. The *Aspergillus niger* multicopper oxidase family: analysis and overexpression of laccase-like encoding genes. **Microbial Cell Factories**, v. 10, n. 1, p. 78, 2011. ISSN 1475-2859. Disponível em: < <http://www.microbialcellfactories.com/content/10/1/78> >.

TANG, Y. et al. Fungal oxidative dissolution of the Mn(II)-bearing mineral rhodochrosite and the role of metabolites in manganese oxide formation. **Environmental Microbiology**,

v. 15, n. 4, p. 1063-1077, 2013. ISSN 1462-2920. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/1462-2920.12029> >.

TAŞTAN, B. E.; ERTUĞRUL, S.; DÖNMEZ, G. Effective bioremoval of reactive dye and heavy metals by *Aspergillus versicolor*. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 3, p. 870-876, 2010. ISSN 0960-8524. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852409011651> >.

TAVARES, A. P. M. et al. Immobilization of laccase on modified silica: Stabilization, thermal inactivation and kinetic behaviour in 1-ethyl-3-methylimidazolium ethylsulfate ionic liquid. **Bioresource Technology**, v. 131, n. 0, p. 405-412, 2013. ISSN 0960-8524. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852412019979> >.

TEKERLEKOPOULOU, A. G.; VASILIADOU, I. A.; VAYENAS, D. V. Biological manganese removal from potable water using trickling filters. **Biochemical Engineering Journal**, v. 38, n. 3, p. 292-301, 2008. ISSN 1369-703X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369703X07002641> >.

THOMPSON, I. A. et al. Fungal manganese oxidation in a reduced soil. **Environmental Microbiology**, v. 7, n. 9, p. 1480-1487, 2005. ISSN 1462-2920. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00842.x> >.

THOMPSON, I. A.; HUBER, D. M.; SCHULZE, D. G. Evidence of a Multicopper Oxidase in Mn Oxidation by *Gaeumannomyces graminis var. tritici*. **Phytopathology**, v. 96, n. 2, p. 130-136, 2006/02/01 2006. ISSN 0031-949X. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-96-0130> >. Acesso em: 2015/01/22.

TSEKOVA, K.; TODOROVA, D.; GANEVA, S. Removal of heavy metals from industrial wastewater by free and immobilized cells of *Aspergillus niger*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 64, n. 6, p. 447-451, 2010. ISSN 0964-8305. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096483051000079X> >.

WATANABE, J. I. et al. As(III) oxidation kinetics of biogenic manganese oxides formed by *Acremonium strictum* strain KR21-2. **Chemical Geology**, v. 347, n. 0, p. 227-232, 2013. ISSN 0009-2541. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009254113001265> >.

WEI, Z.; HILLIER, S.; GADD, G. M. Biotransformation of manganese oxides by fungi: solubilization and production of manganese oxalate biominerals. **Environ Microbiol**, v. 14, n. 7, p. 1744-53, Jul 2012. ISSN 1462-2920 (Electronic) 1462-2912 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22591055> >.

YANG, W. et al. Population Structure of Manganese-Oxidizing Bacteria in Stratified Soils and Properties of Manganese Oxide Aggregates under Manganese-Complex Medium Enrichment. **PLoS ONE**, San Francisco, USA, v. 8, n. 9, p. e73778, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3772008/> >.

YILMAZ, N. et al. Delimitation and characterisation of *Talaromyces purpurogenus* and related species. **Persoonia : Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 29, p. 39-54, 2012. ISSN 0031-5850 1878-9080. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3589794/> >.

ZALAR, P. et al. Phylogeny and ecology of the ubiquitous saprobe *Cladosporium sphaerospermum*, with descriptions of seven new species from hypersaline environments. **Studies in Mycology**, v. 58, p. 157-183, 2007. ISSN 0166-0616 1872-9797. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2104741/> >.

ZHOU, D.; ZHANG, L.; GUO, S. Mechanisms of lead biosorption on cellulose/chitin beads. **Water Research**, v. 39, n. 16, p. 3755-3762, 2005. ISSN 0043-1354. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135405003702> >.

IBRAM. **Informações e Análises da Economia Brasileira**. 7. Instituto Brasileiro de Mineração, 2012.

WHO. **Guidelines for Drinking- water Quality**. 3. World Health Organization, 2008.

CONAMA. **Conselho Nacional do Meio Ambiente - Resolução nº 357, 17/03/2005.**, 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE - **Portaria 2.914/11.**, 2011.

HARTIKAINEN *et al.* Impact of Cadmium, Chromium, Cobalt, Lithium and Manganese to the Growth of Fungi and Production of Enzymes. **Expert Opin Environ Biol**, 2013, 2:3.

Anexos

Anexo A: Alinhamento no CLUSTALW2 para o isolado 7

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```
7B -----CTATAGGGCGAATTGGGCCCGN--GTCG-CATGCTCCCGGCCGCCATGGCGG 49
7C -----CTATAGGGCGAATTGGGCCCGAACGTCG-CATGCTCCCGGCCGCCATGGCGG 51
7A TNANGCTCNTATAGGGCGA-TTGGGCCCGA-CGTCN-TATNCTCCCGGCCGCCATGGCGG 57
      *****  *****  ***  ** *****

7B CC-GCGGGAATTCGATTGGCTGCTGGCACCAGACTTGCCCTCCAATTGTTCCCTCGTTAAG 108
7C CC-GCGGGAATTCGATTGGCTGCTGGCACCAGACTTGCCCTCCAATTGTTCCCTCGTTAAG 110
7A CC-GCGGGAATTCGATTGGCTGCTGGCACCAGACTTGCCCTCCAATTGTTCCCTCGTTAAG 116
      ** *****

7B GGATTTAAATTGTACTCATTCGGATTACAAGACCCAAAAGAGCCCTGTATCAGTATTTAT 168
7C GGATTTAAATTGTACTCATTCGGATTACAAGACCCAAAAGAGCCCTGTATCAGTATTTAT 170
7A GGATTTAAATTGTACTCATTCGGATTACAAGACCCAAAAGAGCCCTGTATCAGTATTTAT 176
      *****

7B TGTCACTACCTCCCGTGTGCGGATTGGGTAATTTGCGCGCCTGCTGCCTTCCTTGGATG 228
7C TGTCACTACCTCCCGTGTGCGGATTGGGTAATTTGCGCGCCTGCTGCCTTCCTTGGATG 230
7A TGTCACTACCTCCCGTGTGCGGATTGGGTAATTTGCGCGCCTGCTGCCTTCCTTGGATG 236
      *****

7B TAGTAGCCGTTTCTCAGGCTCCTTCTCCGGGGTCGAGCCCTAACCTCCGTTACCCGTTG 288
7C TAGTAGCCGTTTCTCAGGCTCCTTCTCCGGGGTCGAGCCCTAACCTCCGTTACCCGTTG 290
7A TAGTAGCCGTTTCTCAGGCTCCTTCTCCGGGGTCGAGCCCTAACCTCCGTTACCCGTTG 296
      *****

7B CCACCATGTTTGGCCAATACCCAAACATCGAATGTTGATAGGGAAGAAATTTGAATGAGC 348
7C CCACCATGTTTGGCCAATACCCAAACATCGAATGTTGATAGGGAAGAAATTTGAATGAGC 350
7A CCACCATGTTTGGCCAATACCCAAACATCGAAGTTGATAGGGAAGAAATTTGAATGAGC 356
      *****

7B CATCGCCGGCACAAGGCCGTGTCGATTGACTAGTTATCATGATTACCAGAGAGCCCCGA 408
7C CATCGCCGGCACAAGGCCGTGTCGATTGACTAGTTATCATGATTACCAGAGAGCCCCGA 410
7A CATCGCCGGCACAAGGCCGTGTCGATTGACTAGTTATCATGATTACCAGAGAGCCCCGA 416
      *****

7B GGGGCATTGGTTTTTAATCTAATAAATACATCCCTTCCGAAGTCGGGATTTTCAGCATGT 468
7C GGGGCATTGGTTTTTAATCTAATAAATACATCCCTTCCGAAGTCGGGATTTTCAGCATGT 470
7A GGGGCATTGGTTTTTAATCTAATAAATACATCCCTTCCGAAGTCGGGATTTTCAGCATGT 476
      *****

7B ATTAGCTCTAGAATTACCACGGTTATCCAAGTAGTAAAGTATTATCAAATAAACGATAAC 528
7C ATTAGCTCTAGAATTACCACGGTTATCCAAGTAGTAAAGTATTATCAAATAAACGATAAC 530
7A ATTAGCTCTAGAATTACCACGGTTATCCAAGTAGTAAAGTATTATCAAATAAACGATAAC 536
      *****

7B TTATATAATGAGCCATTTCGAGTTTCGCGGTATAATGCTTATACTTAGACATGCATGGC 588
7C TTATATAATGAGCCATTTCGAGTTTCGCGGTATAATGCTTATACTTAGACATGCATGGC 590
7A TTATATAATGAGCCATTTCGAGTTTCGCGGTATAATGCTTATACTTAGACATGCATGGC 596
      *****

7B TTAATCTTTGAGACAAGCATATGA-CTACAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCTGCAGG 647
7C TTAATCTTTGAGACAAGCATATGA-CTACAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCTGCAGG 649
7A TTAATCTTTGAGACAAGCATATGNACTACAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCTGCAGG 656
      *****

7B TCGA-CCATATGGGA-GAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTG 705
7C TCGAACCATATGGGA-GAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTG 708
7A TCGA-CCATATGGGA-GAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTG 714
      **** *****

7B TCACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGGGAAATTGTTNNCC 765
7C TCACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAANT-GTTATCC 767
7A TCACCTAATNAGCTTGGCGTAN-CATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAATTTGTTATCC 773
      *****
```

```

7B      GCTCACAATTCCCCACAACATACGAGCCGGAAGCATAAANNGNAA-GCCT--GGGGTGCC 822
7C      GCTCACAAT-CCCCACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCCT--GGGGGGNC 824
7A      NCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCCTGGGGGGGCC 833
          ***** ** *****
          * * * * *

7B      TAATGAGNGANCTA-CTCANATNA-TTGCCTTGGCTCACGGCCG-CTTTCNNTCGGGA 879
7C      NAATGAGNGANCTA-NTCANNTAA-NTGCGTTGGCTCANNNCCN-CTTTCANNTCGGNA 881
7A      TAATGAGTGANCTAACTCACATTAATTGCGTTGGCTCACTGCCCGCTTTCAGTCGGGA 893
          ***** ** * * ***** ** * * ***** ** * *
          * * * * *

7B      A-ACTGTCGNGCCNCTG--CATNA-TGAATCGNCCNANNCCN--GGGGANNCGGTTNGNT 933
7C      A-CCTGNCNGGCCACNG--CNTTAATGAATCGNCCACGCC--GGGAAAGNGNTTGCN 936
7A      AANCTGTCNTGCCANCNGCNATTA-TGAATCGNCCNACCCCGGGGAAGCGGTTTGCN 952
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
          * * * * *

7B      N-TNGGGNNTTTTCNCTTCNNGNTNA-TNAATNNTGNCNN 971
7C      NATGGGGNNTTTTCNNTTCNNGNTAANNAATCANNNGNCN 976
7A      TTTTGGGGN----CTCTTNCNNTTCN-----TNGNTA 980
          * * * * * * * * *

```

Anexo B: Alinhamento no CLUSTALW2 para o isolado 18

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```

18A      -TTAA-ANTCNTATAGGGCGAATTGGGCCGAAGTCGCATTTNTCCGGCCGCATGGAAG 58
18B      GCCAGCAGCCGC---GGTAATCCAGCTCCAA-TAGCGTATATT-----AAAG 44
18C      -----
          -----

18A      --GCCGCGGTTNTCCCATTAAGCTCGGAATTGAACCTTGGGCCGTCCTGCCGGTCCGC 116
18B      TTGTTGCANTTAA-----AANNCTCGTAGTTGAACCTTGGGCCGTCCTGCCGGTCCGC 98
18C      -----GTTTAACTTGGGCCGTCCTGCCGGTCCGC 31
          ** *****

18A      CTC-TCGCGAGNCCTGGTCCGGATGGGNCCTTCTTTCTGGGGAATCCCATGGCCTTCACT 175
18B      CTCACCGCGAGTACTGGTCCGGATGGGCCTTCTTTCTGGGGAATCCCATGGCCTTCACT 158
18C      CTCACCGCGAGTACTGGTCCGGATGGGCCCTTCTTTCTGGGGAATCCCATGGCCTTCACT 91
          *** ***** * *****

18A      GGCTGTGGCGGGGAA-CCAGGACTTTTACTGTGAAAAAATTANAGTGTTCAAAGCANGCC 234
18B      GGCTGTGGCGGGGAA-CCAGGACTTTTACTGTGAAAAAATTAGAGTGTTCAAAGCANGCC 217
18C      GGCTGTGGCGGGGAA-CCAGGACTTTTACTGTGAAAAAATTAGAGTGTTCAAAGCANGCC 150
          ***** * * * * *

18A      TTTGCTCGGATACATTAGCATGGAATAATAGAATAGGACGTGCGGTTCTATTTTGTGGT 294
18B      TTTGCTCGGATACATTAGCATGGAATAATAGAATAGGACGTGCGGTTCTATTTTGTGGT 277
18C      TTTGCTCGGATACATTAGCATGGAATAATAGAATAGGACGTGCGGTTCTATTTTGTGGT 210
          *****

18A      TTCTANGACCGCCGTAATGATTAATAGGGATAGTCGGGGCGTCAGTATTCAGCTGTGAG 354
18B      TTCTAGGACCGCCGTAATGATTAATAGGGATAGTCGGGGCGTCAGTATTCAGCTGTGAG 337
18C      TTCTAGGACCGCCGTAATGATTAATAGGGATAGTCGGGGCGTCAGTATTCAGCTGTGAG 270
          *****

18A      AGGTGAAATTCCTGGATTTGCTGAAGACTAACTACTGCGAAA-GCATTGCGCAAGGATGT 413
18B      ANGTGAAATTCCTGGATTTGCTGAAGACTAACTACTGCGAAAAGCATTNCCAAGGATGT 397
18C      AGGTGAAATTCCTGGATTTGCTGAAGACTAACTACTGCGAAA-GCATTGCGCCAGGATGT 329
          * *****

18A      TTTTATTAATCAGGAAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACNATCANATACCGTCGTANTC 473
18B      TTTTATTAATCAGGAAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTC 457
18C      TTTNGTTANTCAGGAA-CGAAAGTTANGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTANTC 388
          *** ** * * * * *

18A      TTAACCATAAACTATGCCGACTAGGGATCGGGCGGGGTTTCTATGATGACCCGCTCGGCA 533
18B      TTAANGTAAACTATGCCGACTAGGGATCGGGCGGGGTTTCTANGATGACCCGCTCGGCA 517
18C      TTAACCATAAACTATGCCGACTAGGGATCGGGCGGGGTTTCTATGATGACCCGCTCGGCA 448
          *** *****

18A      CCTTACGAGAAATCAAAGTTTTTGGGTTCTGGGGGAGTATGGNTCGCAANGCTGAAACT 593
18B      C-TTACGAGAAATCAAAGTTTTTGGGTTCTGGGGGAGTATGGT-CGCAAGGCTGAAACT 575
18C      CCTTACGAGAA-TCAAAGTTTTTGGGTTCTGGGGGAGTATGGT-CGCANG-CTNAA-CT 504
          * ***** ** * * *

```

```

18A      TANAGAAATTGACGGAANGGCACCACANGGCGTGGAGCCTGCGGCTTAATCTGACTCAAC 653
18B      TAAAGAAATTGACGGAAGGGCACCACAAGGCGTGGNGCCTGCNGCTTA--TTNACTTNCC 633
18C      TAAA-AAATTGACGGAAGGCC--CACNTG-CGTG-AGCCNGCCGCTTANTCTGACTCA-C 558
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
18A      ACGNGAAACTCANCANGTCCAGACAAAATAAGGAT--TGAN-NGATTGANAGCTCTTT- 709
18B      ACGGGGAA-CTCACCAGNNC-AGACAAA-TAANGATGACGATGAGACTGNTCTNTNTTTG 690
18C      ANTGGTAN-----CCACAGTCAGACAAA-TANAGATGACGATGAAGCCCTTCTTACTTTT 612
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
18A      -----CT---GAC-----CCTTTG----- 720
18B      GATGGGGGCN---GNCGTCTATTGNNANGTFTN--AGCTATNCATANAAAACTCGCC- 743
18C      GATG---GNTCAAGCCNTCENNATAGNGANAATTNC--GCTACTNANANANAAACTGGCC 666
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
18A      -----GATGGGGNG 729
18B      -TAAANCNGNCCGTTGGGCCTGCTNTAAGAACGT--CGCANAAACAGAAACNGNGNANAN 800
18C      TTANCCCGNCCNTNCGNCCGCTCTNTGGATACGANACCAGANAAGATANGTNGNATNN 726
          *
18A      CAT-----G----- 733
18B      CTTAN---CNCNCGAGTACAATGA----- 821
18C      NNTATATTGCCCCNAGCNCAATTGN-----ANTCCGCTTGANAACNTNNTAANTCCAT 778
          *
18A      -----GCCNT 738
18B      -----ACCAC 826
18C      TTTNAAACGCTACTTGGTNTATNACNCCCTCCANANGACNAAAAGATCGGTCAAGNNCNAA 838
          *
18A      -CTTAN-----TTG----- 746
18B      CCTNANCAGTNNNTNAANC-----CA 846
18C      CNTNNANATTTATNANNNTCNCATAAAACNAGAACNTNTTGATTANACATNACNCCN 898
          * *
18A      ---NGGANTG-----ATTGT-----CTGCTT-----AT----- 766
18B      AACTGGACCG-----NTNNTTCNTAANTTCCCNCNCCNACAAAAN---GA 889
18C      AAGTNNAAANN-----ANTAATGTAGNNNNNNANANATAANGANTTATCN 944
          * *
18A      -----TGNNNA-AANNAANANA----- 781
18B      CGGGCAGGNNAAANTTGTC-----CCCCCTCCGAANNNNNCANANCNNNG----- 934
18C      NNTATCAGAGAANNNTTAACCACNTTTNCCNAANCNNGGANANNNTATNATGGAAGCTNA 1004
          *
18A      -----CNCNGCC- 788
18B      -----AGGTNAGGTTNTNC-----CNCCCTNNCG 958
18C      NTGCTAGTATNAANNNTNNGANNCCN---NANANTATTNNATTNNANTTTTACTNNNNNA 1061
          *
18A      -----TNA---NANCCN----- 798
18B      -GGNCCNANA---NNCNNTA---ANNA----- 980
18C      AGCCNAGNNNCCNCCNNTATNTATNATNCCNNTCCNACANNNNATNTNTTATNNAN 1121
18A      ----- 799
18B      -AAAAA----- 989
18C      TANAGANANACNTANNATTNATTCNNANNTTNAANCTGTCNNNTCNNTCTTN 1176

```

Anexo C: Alinhamento no CLUSTALW2 para o isolado 23

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```

Renata_23C_ITS5      -CTRGCK---ACTGMGGAGGA-CATTACYGAGTGCGGGCTGCCTCCSGGCGCCCRACCTC 55
Renata_23A_ITS5      CTTGGGG---ACTGMGGAGGA-CATTACYGAGTGCGGGCTGCCTCCSGGCGCCCRACCTC 56
Renata_23B_ITS5      -TKKKGGGKTACTGCGGAGGATCATTACTGAGTGCGGGCTGCCTCCGGGCGCCCAACCTC 59
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

```

Renata_23C_ITS5      CCMCCCRGTGACTACCTAACACTGTWGCTTCGGCGGGGAGCCCTCTAGGGGGCGAGCCGCC 115
Renata_23A_ITS5      CCACCCRTGACTACCTAACACTGTTGCTTCGGCGGGGAGCCCTCTCGGGGGCGAGCCGCC 116
Renata_23B_ITS5      CCACCCGTGACTACCTAACAYTGTGCTTCGGCGGGGAGCCCTCTCGGGGGCGAGCCGCC 119
** ** *

Renata_23C_ITS5      SGGSACTACTGAACTTCAYGCCTRAKAGTGATGCAKTCTGAGTCTGAATATWATATCART 175
Renata_23A_ITS5      CGGSACTACKGAACTTCACGCCWGAKAGTGATGCATTCTGAGTCTGAATATAATATCART 176
Renata_23B_ITS5      GGGGACTACYGAACTTCATGCCTGAGAGTGATGCAGTCTGAGTCTGAATATAAAATCAGT 179
** *****

Renata_23C_ITS5      CAAAAC TTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAKAAMGCAKCGMAMTGCS 235
Renata_23A_ITS5      CAAAAC TTTCAACAATGGATCTCTWGGTTCCGGCATCGATGAAKAAMGCMCTMAMTGCS 236
Renata_23B_ITS5      CAAAAC TTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATRAAGAACGCAGCGAACTGCG 239
*****

Renata_23C_ITS5      ATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATGGCGCC 295
Renata_23A_ITS5      ATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATKGCGCC 296
Renata_23B_ITS5      ATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCC 299
*****

Renata_23C_ITS5      CCCTGGCATTCGGGGGGCATGCCTGTCCRAGCGTCATTGCTGCCCATCAAGCCCGGCTT 355
Renata_23A_ITS5      CCCTGGCATTCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCATCAAGCCCGGCTT 356
Renata_23B_ITS5      CCCTGGCATTCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCATCAAGCCCGGCTT 359
*****

Renata_23C_ITS5      GTGTGTG YGGTTCGTCGTC CCCCCCGGGGACGGGCCSAAAGGCRGCGGGCMCCGTGT 415
Renata_23A_ITS5      GTGTGTG YGGTTCGTCGTC CCCCCCGGGGACGGGCCSAAAGGCAGCGGGCACCGTGT 416
Renata_23B_ITS5      GTGTGTG YGGTTCGTCGTC CCCCCCGGGGACGGGCCRAAAGGCAGCGGGCMCCGTGK 419
*****

Renata_23C_ITS5      CCSGTCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACCCGCTCGATTTAGGGCCGGCCGGCGCCAG 475
Renata_23A_ITS5      CCSGTCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACCCGCTCGATTTAGGGCCGGCCGGCGCCAG 476
Renata_23B_ITS5      CCGGTCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACCCGCTCGATTTAGGGCCGGCSGGSGCCAG 479
** *****

Renata_23C_ITS5      CCGACGTCCAACCATTTTTCTTCAGGTTGACCTCRGATCAGGTAGGATAACCCGCTGAAC 535
Renata_23A_ITS5      CCGACKTCCAACCATTTTTCTTCAGGTTGACCTCGGAKCAGGTMGGGATAACCCSCTGAAC 536
Renata_23B_ITS5      CCGACSTCCAACCATTTTTCTTCAGGTTGACCTCGRAYCAGGTRGGWTCCKCTGAAC 539
*****

Renata_23C_ITS5      TTAAGCATATCAA-AAGSCGGASGAAGGATCAGGTAGGAATMCCCSCTRAACTTAGGCAT 594
Renata_23A_ITS5      TTAAGCATATCAGTAAGGYKGASGACGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCAT 596
Renata_23B_ITS5      TYAAGCATATCAC-AWKGCGGAS--MS----- 563
* *****

Renata_23C_ITS5      ATCAWTAAGSSGGAGRRAA 613
Renata_23A_ITS5      ATCATAAGGCGGGAGAGAA 615
Renata_23B_ITS5      -----

```

Anexo D: Alinhamento no CLUSTALW2 para o isolado 26

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```

Renata_26B_ITS5      TWRGGKKKAACCTGCCGGAAGRATCATTACTGAGTGCGGGCTGCCTCCGGGGCGCCAAC 60
Renata_26A_ITS5      CTRRGSKGA-CGTGM-GGAGGW--CATTACTGAGTGCGGGCTGCCTCCGGG-CGCCAAC 55
Renata_26C_ITS5      -TWKKTWAM--ATGM-GAAGGW--CATTACTGAGTGCGGGCTGCCTCCGGS--SSCCAAC 52
                      ** * * * *****

Renata_26B_ITS5      CTCCCACCCGTGACTACCTAACACTGTTGCTTCGGCGGGGAGCCCTCTCGGGGGCAGCC 120
Renata_26A_ITS5      CTCCCACCCGTGACTACCTAACACTGTTGCTTCGGCGGGGAGCCCTCTCGGGGGCAGCC 115
Renata_26C_ITS5      CTCCCACCCGTGACTACCTAACACTGTTGCTTCGGCGGGGAGCCCTCTCGGGGGCAGCC 112
                      *****

Renata_26B_ITS5      GCCGGGACTACTGAACTTCATGCCTGAGAGTGATGCAGTCTGAGTCTGAATATAAAAAT 180
Renata_26A_ITS5      GCCGGGACTACTGAACTTCATGCCTGAGAGTGATGCAGTCTGAGTCTGAATATAAAAAT 175
Renata_26C_ITS5      GC-GGGGACTACTGAACTTCATGCCTGAGAGTKATGCAGTCTGAGTCTGAATATAAAAAT 171
                      ** *****

Renata_26B_ITS5      CAGTCAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAC 240
Renata_26A_ITS5      CAGTCAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAC 235
Renata_26C_ITS5      CAGTCAAACTTTMAACAATGGATCTCTKGGTTCGGCATCGATRAAGAACGCRGCRAAC 231
                      *****

Renata_26B_ITS5      TGCATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTG 300
Renata_26A_ITS5      TGCATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTG 295
Renata_26C_ITS5      TGCGAWAAGWAATGTGAATKGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATKG 291
                      *****

Renata_26B_ITS5      CGCCCCCTGGCATTCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCATCAAGCCCG 360
Renata_26A_ITS5      CGCCCCCTGGCATTCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCATCAAGCCCG 355
Renata_26C_ITS5      CGCCCCCKGGCATTCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTSCYSCCAYMAAGCCCG 351
                      *****

Renata_26B_ITS5      GCTTGTGTGTGGGTGCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTC 420
Renata_26A_ITS5      GCTTGTGTGTGGGTGCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTC 415
Renata_26C_ITS5      GYTTGTGTGK--GGKCGYSYCCCCSSGGGR--ASGMCCRAAAGS-AGCGS-GGCMCC 404
                      * *****

Renata_26B_ITS5      GTGTCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTACCCGCTCGATTTAGGGCCGGCCGGGCG 480
Renata_26A_ITS5      GTGTCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTACCCGCTCGATTTAGGGCCGGCSGGGCG 475
Renata_26C_ITS5      GTGTCCGGYCT--GAGCKTW--GGGCTTK-TMACCCGCY-GATK-AGGGCGG--CGGGC- 454
                      *****

Renata_26B_ITS5      CCAGCCGACGTCCAACCATTTTTCTTCAGTTGACCTCGGATCAGGTRGGAYACCCGCT 540

```



```

Renata_26A_ITS5      CCAGCCGACGTCCAACCATTTTTCTTCAGGTTGACCTCRGATCAGGTRGGGAYMCCCGCT 535
Renata_26C_ITS5      MCASC--RMYTCMARC---KTTTTYTCAGKT--GMCTCRGM-CMGGWRGK---ACCCSY- 502
                      ** *      ** * *      ***  **** *      *** *  * ** **      ***

Renata_26B_ITS5      GAACTTAAGCATATMATAAAGCCGRARRA- 569
Renata_26A_ITS5      GAACTTAAGCATATCATAARGSGGRRRGA 565
Renata_26C_ITS5      GAAYW-AAGAAAAT---ARGSGRRAA--- 524
                      ***  *** * **      * *

```

Anexo E: Espécies recuperadas

Tabela 10: Alinhamento local Blast utilizando a sequência do consenso 18 com as sequências de material tipo depositadas no banco de dados NCBI.

| Espécie - Número de acesso | E-Value | Identidade |
|---|----------------|-------------------|
| <i>Talaromyces flavus</i> var. <i>flavus</i> GU733356.1 | 0,0 | 99% |
| <i>Acremonium cellulolyticus</i> AB474750.1 | 0,0 | 99% |
| <i>Talaromyces viridis</i> AB024587.1 | 0,0 | 99% |
| <i>Paecilomyces aeruginus</i> AY526484.2 | 0,0 | 99% |
| <i>Sagenomella verticillata</i> AB024594.1 | 0,0 | 98% |
| <i>Sagenomella diversispora</i> AB024589.1 | 0,0 | 98% |
| <i>Talaromyces byssochlamydoides</i> AY526476.2 | 0,0 | 97% |
| <i>Phialosimplex chlamydosporus</i> GQ169326.1 | 0,0 | 97% |
| <i>Sagenomella sclerotialis</i> AB024592.1 | 0,0 | 97% |
| <i>Aspergillus restrictus</i> GU733349.1 | 0,0 | 97% |
| <i>Emericella nidulans</i> AB008403.1 | 0,0 | 97% |
| <i>Phanerochaete chrysosporium</i> GU733344.1 | 0,0 | 97% |
| <i>Eurotium herbariorum</i> AB002069.1 | 0,0 | 97% |
| <i>Eurotium herbariorum</i> AB008402.1 | 0,0 | 97% |
| <i>Xeromyces bisporus</i> FJ358355.1 | 0,0 | 97% |
| <i>Thermoascus crustaceus</i> AY526486.2 | 0,0 | 97% |
| <i>Talaromyces spectabilis</i> AY526473.2 | 0,0 | 97% |
| <i>Eupenicillium limosum</i> EF411061.1 | 0,0 | 97% |
| <i>Monascus pilosus</i> AB024047.1 | 0,0 | 97% |
| <i>Hamigera striata</i> AB003948.1 | 0,0 | 96% |

Tabela 11: Alinhamento local Blast utilizando a sequência do consenso 26 com as sequências de material tipo depositadas no banco de dados NCBI.

| Espécie (Número de acesso) | E-value | Identidade |
|---|----------------|-------------------|
| <i>Aspergillus austroafricanus</i> JQ301891.1 | 0,0 | 99% |
| <i>Aspergillus jensenii</i> JQ301892.1 | 0,0 | 98% |
| <i>Aspergillus tennesseeensis</i> JQ301895.1 | 0,0 | 98% |
| <i>Aspergillus griseoaurantiacus</i> KJ775553.1 | 0,0 | 99% |
| <i>Aspergillus creber</i> JQ301889.1 | 0,0 | 98% |
| <i>Aspergillus subversicolor</i> JQ301894.1 | 0,0 | 97% |
| <i>Aspergillus venenatus</i> JQ301896.1 | 0,0 | 98% |
| <i>Aspergillus puulaauensis</i> JQ301893.1 | 0,0 | 98% |
| <i>Aspergillus nidulans</i> NR_130654.1 | 0,0 | 96% |
| <i>Emericella nidulans</i> KC146354.1 | 0,0 | 96% |
| <i>Emericella similis</i> EU448279.1 | 0,0 | 97% |
| <i>Emericella undulata</i> EU448275.1 | 0,0 | 96% |
| <i>Aspergillus bisporus</i> EF661208.1 | 0,0 | 90% |
| <i>Aspergillus amylovorus</i> FJ531161.1 | 0,0 | 93% |
| <i>Aspergillus cavernicola</i> FJ531155.1 | 0,0 | 93% |
| <i>Aspergillus puniceus</i> NR_103579.1 | 0,0 | 88% |

Tabela 12: Alinhamento local Blast utilizando a sequência do consenso 31 com as sequências de material tipo depositadas no banco de dados NCBI.

| Espécie (Número de acesso) | <i>E-value</i> | Identidade |
|---|-----------------------|-------------------|
| <i>Cladosporium halotolerans</i> NR_119605.1 | 0,0 | 99% |
| <i>Cladosporium sphaerospermum</i> AY361958.1 | 0,0 | 96% |
| <i>Cladosporium colombiae</i> NR_119729.1 | 0,0 | 95% |
| <i>Cladosporium pini-ponderosae</i> NR_119730.1 | 0,0 | 95% |
| <i>Cladosporium antarcticum</i> NR_121332.1 | 0,0 | 94% |
| <i>Cladosporium ossifragi</i> EF679381.2 | 0,0 | 94% |
| <i>Cladosporium antarcticum</i> EF679334.2 | 0,0 | 94% |
| <i>Cladosporium aphidis</i> NR_120010.1 | 0,0 | 97% |
| <i>Cladosporium arthropodii</i> NR_120011.1 | 0,0 | 95% |
| <i>Cladosporium grevilleae</i> NR_119960.1 | 0,0 | 96% |
| <i>Cladosporium exasperatum</i> NR_119843.1 | 0,0 | 95% |
| <i>Cladosporium asperulatum</i> NR_119836.1 | 0,0 | 95% |
| <i>Cladosporium chalastosporoides</i> NR_119838.1 | 0,0 | 95% |
| <i>Cladosporium oxysporum</i> HM148118.1 | 0,0 | 95% |
| <i>Cladosporium tenuissimum</i> NR_119855.1 | 0,0 | 95% |
| <i>Cladosporium australiense</i> NR_119837.1 | 0,0 | 95% |
| <i>Cladosporium cladosporioides</i> NR_119839.1 | 0,0 | 95% |
| <i>Cladosporium macrocarpum</i> NR_119657.1 | 0,0 | 94% |
| <i>Cladosporium funiculosum</i> AY362000.1 | 0,0 | 95% |
| <i>Cladosporium colocasiae</i> AF393694.2 | 0,0 | 95% |

Anexo F: Árvore Filogenética referente ao isolado 18 – Sequências de material tipo



Figura 49: Árvore filogenética baseada do isolado 18 na sequência da região 18S ribossomal: A árvore filogenética foi construída utilizando o algoritmo Kimura, *Neighbor-Joining* por meio do programa FigTree 1.4.2, mostrando que o isolado pertence ao gênero *Penicillium/Talaromyces*.

Anexo G: Árvore Filogenética referente ao isolado 26 – Sequências de material tipo

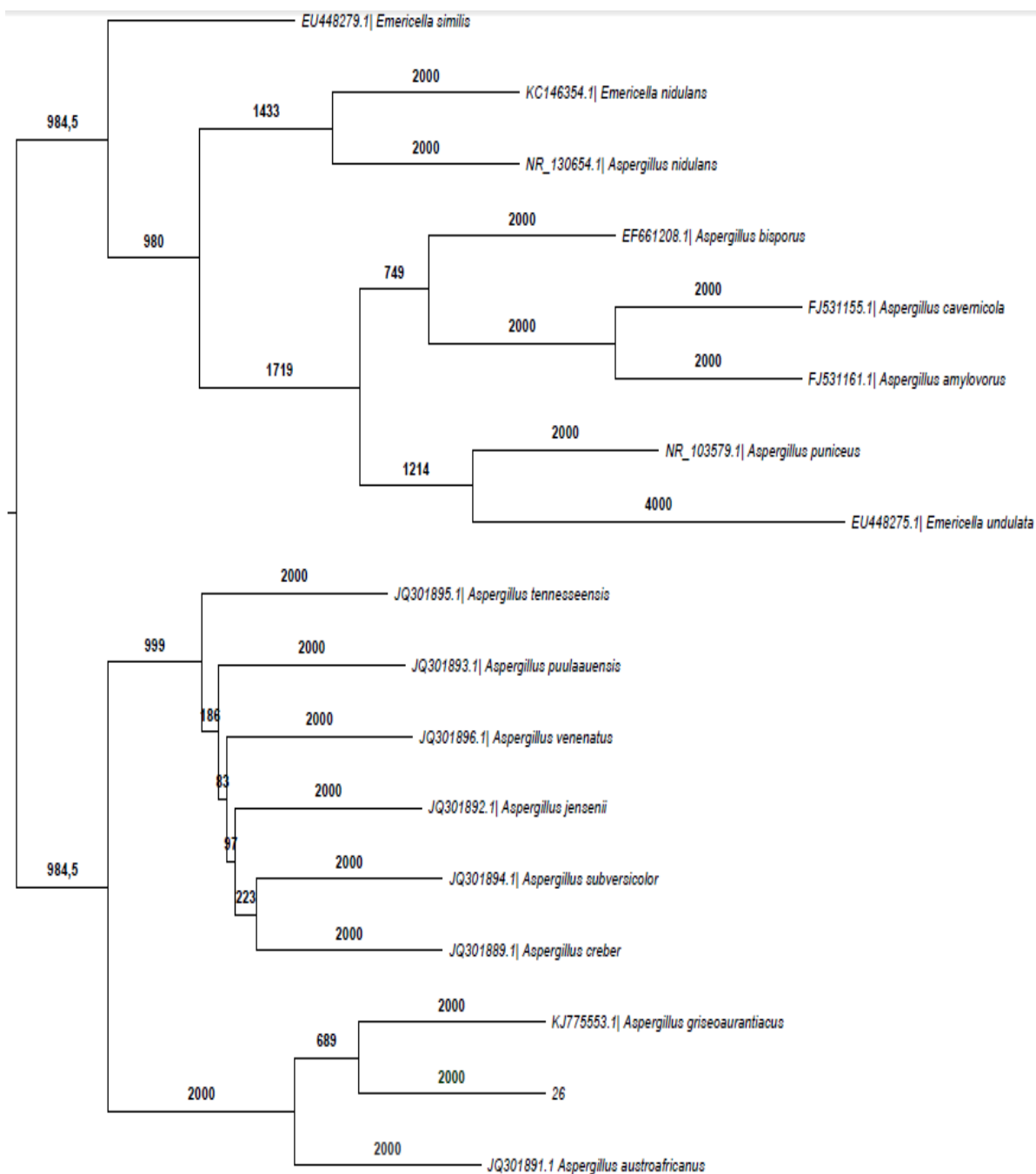


Figura 50: Árvore filogenética baseada do isolado 18 na sequência da região ITS ribossomal: A árvore filogenética foi construída utilizando o algoritmo Kimura, *Neighbor-Joining* por meio do programa FigTree 1.4.2, mostrando que o isolado pertence ao gênero *Aspergillus*.

Anexo H: Árvore Filogenética referente ao isolado 31 – Sequências de material tipo

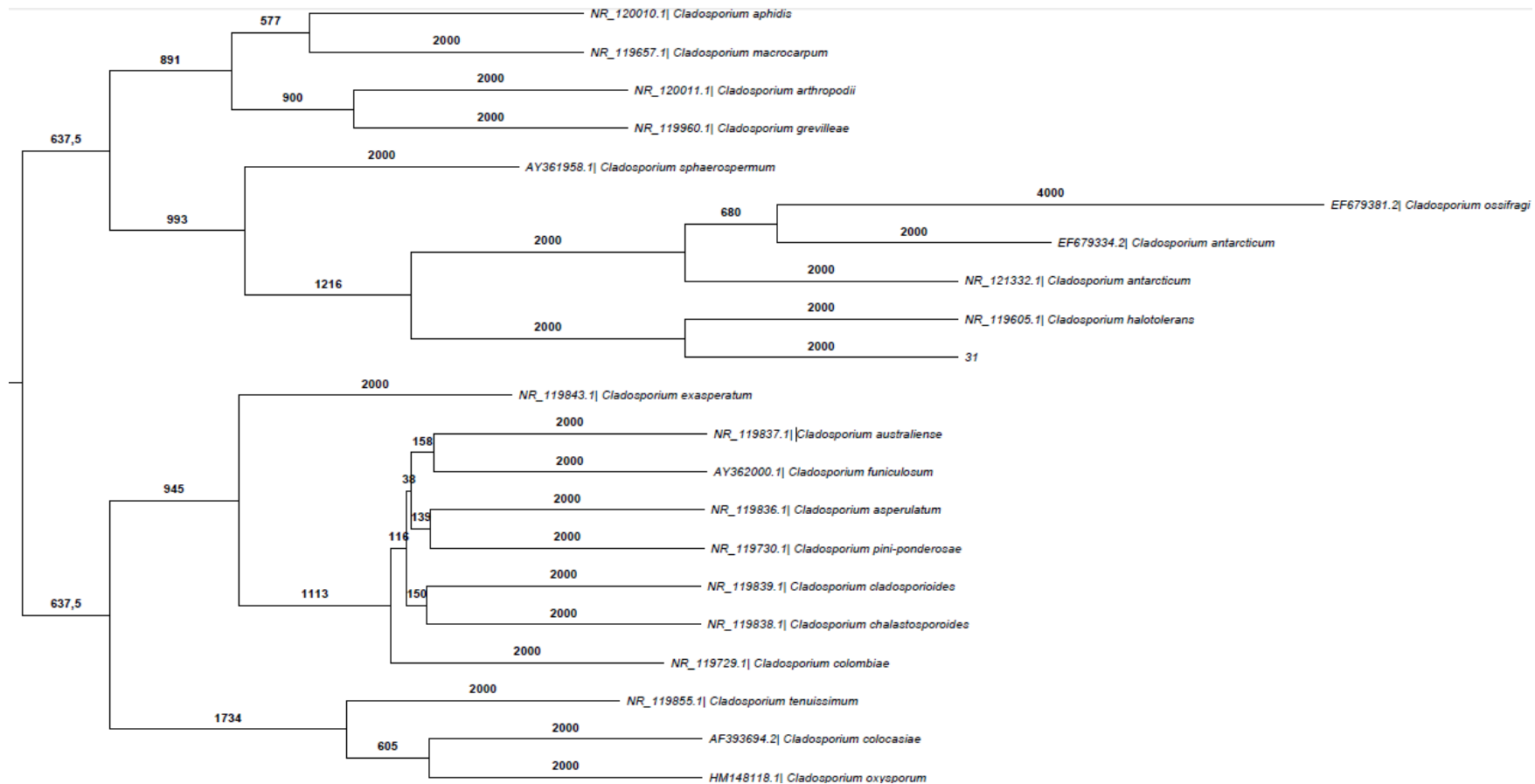


Figura 51: Árvore filogenética baseada do isolado 18 na sequência da região ITS ribossomal: A árvore filogenética foi construída utilizando o algoritmo Kimura, *Neighbor-Joining* por meio do programa FigTree 1.4.2, mostrando que o isolado pertence ao gênero *Cladosporium*